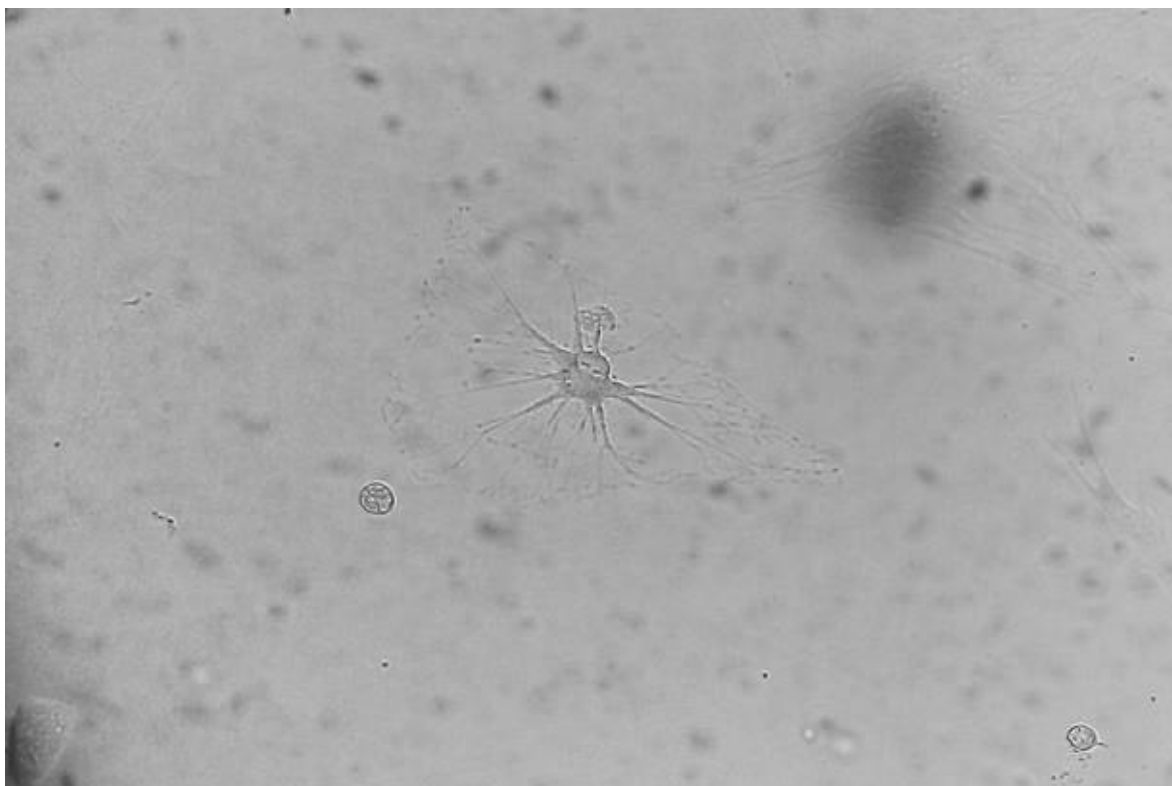


*Universidad Nacional de La Plata*  
*Facultad de Ciencias Exactas*  
*Departamento de Ciencias Biológicas*



*Rol de la angiogénesis en los procesos de  
proliferación y diferenciación adipocitaria del tejido  
adiposo visceral*

*Trabajo de Tesis Doctoral*

*Bioquímico Juan Pablo Fariña*

*2017*





“

*a sea que piense que puede,  
o que piense que no,  
está en lo cierto”*

*Henry Ford (1863-1947)*

## AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos nunca son suficientes. El trabajo de tesis de una persona es su esfuerzo, sumado a la colaboración de muchas voluntades.

Quisiera comenzar agradeciendo a la persona que dirigió mi tesis, el Dr. Juan José Gagliardino. Estricto en lo académico y cálido en lo personal, encontré en él y en su gran capacidad profesional una fuente de inspiración hacia el trabajo.

Agradezco asimismo al Dr. Andrés Giovambattista su colaboración como codirector de mi tesis, aportando conocimiento y entrenamiento en la metodología y años de experiencia en el campo.

Deseo continuar agradeciendo a la persona que me introdujo al CENEXA y entrenó durante mis primeros años, la Dra. María Elisa García. Metódica y muy prolija, la Dra. García me brindó entrenamiento y, en el proceso, su invaluable amistad.

Gracias también a la Dra. Lisi Román, querida coequipper, con quien comenzamos el doctorado y una gran amistad. Sus palabras de aliento en momentos difíciles son un regalo que desborda generosidad.

Dice una voz popular que uno no conoce en profundidad algo hasta que tiene que explicarlo. Y también pude experimentarlo, teniendo el placer y honor de tutelar la tesina de la Lic. (y actual doctorando) Florencia Martín. ¡Gracias Flor por tu paciencia!

También agradecer al Lic. Mauricio Kraemer su responsable apoyo técnico, entre charlas y buena onda. Lo mismo puedo agradecer de la Dra. Bárbara Maiztegui y el Dr. Luis Emilio Flores.

Extiendo mi agradecimiento a todo el equipo del CENEXA, un lugar del que me llevo mucha experiencia y aprendizaje sobre la ciencia en particular y sobre la vida en general.

También deseo agradecer el entrenamiento, explicaciones y paciencia recibidos de la Dra. Guillermina Zubiría.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera asimismo agradecer a la Universidad Nacional de La Plata, casa de altos estudios que abrió sus puertas para mí y me otorgó la beca doctoral que hizo posible la realización del presente trabajo.

Personalmente, no tengo palabras para agradecer a mi papá, a mi vieja, a Anita, a mis hermanos, a mis tíos y primos (que me recibieron en la bella ciudad de La Plata) y a todos en mi gran familia, y a mi amor Daniela Quintero. Sus palabras de aliento, su apoyo en mis momentos difíciles, sus corazones abiertos y su actitud de darme lo mejor de ellos es más de lo que puedo pedir. Los quiero infinitamente.

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>- 6 -</b>
Breve historia del sobrepeso.....	- 6 -
Concepto actual de obesidad .....	- 9 -
Perspectiva mundial y argentina .....	- 10 -
Tejido adiposo .....	- 11 -
Leptina .....	- 12 -
Adiponectina.....	- 14 -
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	- 14 -
Interleuquina 6 (IL-6) .....	- 15 -
Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) .....	- 15 -
Quemerina .....	- 15 -
Tipos de tejido adiposo .....	- 16 -
Adipogénesis.....	- 18 -
Primeros conceptos .....	- 18 -
Conceptos actuales.....	- 19 -
Balance entre mecanismos de hipertrofia e hiperplasia durante la expansión del tejido adiposo.....	- 23 -
Procesos de muerte celular adipocitaria: apoptosis y autofagia.....	- 24 -
Identificación y caracterización de Células Progenitoras Adipocitarias .....	- 26 -
Compromiso preadipocitario .....	- 27 -
Angiogénesis y su relación con el proceso adipogénico .....	- 28 -
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>- 31 -</b>
Animales .....	- 31 -
Diseño experimental .....	- 31 -

Obtención de plasma y tejido adiposo visceral .....	- 32 -
Determinación de glucemia .....	- 32 -
Determinación de Triglicéridos .....	- 32 -
Determinación de TBARS ( <i>ThioBarbituric Acid Reactive Substances</i> ) .....	- 32 -
Determinación de proteínas .....	- 33 -
Determinación de insulina .....	- 33 -
Determinación de leptina en medio y leptinemia.....	- 34 -
Determinación de NEFA ( <i>Non-Esterified Fatty Acids</i> ; Ácidos grasos no esterificados).....	- 35 -
Obtención de cortes histológicos.....	- 35 -
Determinación del porcentaje de área vascular .....	- 35 -
Determinación del diámetro adipocitario .....	- 36 -
Digestión del TAV y obtención de células de la FEV .....	- 36 -
Citometría de flujo.....	- 37 -
Cultivo de células de la FEV .....	- 38 -
Proliferación de células de la FEV .....	- 39 -
Diferenciación de las células en confluencia .....	- 39 -
Porcentaje de células diferenciadas y grados de diferenciación .....	- 40 -
Determinación de la composición de ácidos grasos mayoritarios y de triglicéridos .....	- 42 -
Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	- 42 -
Obtención de ARN total .....	- 42 -
Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	- 43 -
Diseño de cebadores .....	- 44 -
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	- 46 -
Análisis estadístico .....	- 47 -
RESULTADOS.....	- 48 -
Parámetros corporales y alimentarios.....	- 48 -

<b>Indicadores metabólicos generales .....</b>	<b>- 48 -</b>
<b>Tejido adiposo visceral .....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>Parámetros generales.....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>Histología del tejido adiposo.....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>Análisis de la expresión génica del tejido adiposo visceral (cepa Wistar) .....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>Análisis de la expresión génica del tejido adiposo visceral (cepa Sprague-Dowley) .....</b>	<b>- 54 -</b>
<b>Composición de ácidos grasos del Tejido adiposo visceral .....</b>	<b>- 56 -</b>
<b>Células de la Fracción Estroma Vascular .....</b>	<b>- 58 -</b>
<b>Parámetros generales.....</b>	<b>- 58 -</b>
<b>Citometría de flujo de células de la fracción estroma vascular .....</b>	<b>- 58 -</b>
<b>Análisis de la expresión génica de células de la fracción estroma vascular .....</b>	<b>- 59 -</b>
<b>Estudio de proliferación celular .....</b>	<b>- 61 -</b>
<b>Análisis de la expresión génica de células al final del período de proliferación (día 6 de proliferación) .....</b>	<b>- 62 -</b>
<b>Secreción de leptina en función de los días de diferenciación .....</b>	<b>- 63 -</b>
<b>Porcentaje de células diferenciadas a fin de cultivo (día 10 de diferenciación) .....</b>	<b>- 64 -</b>
<b>Determinación de grados de diferenciación de células al fin de cultivo (día 10 de diferenciación) .....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>Expresión génica de células al término del período de cultivo (día 10 de diferenciación) ....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>- 68 -</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>- 74 -</b>



## ABREVIATURAS

3T3-L1: Línea de Células Progenitoras Adipocitarias generadas en el NIH cuya diferenciación espontánea se dirige hacia el linaje blanco.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Ang-1 y Ang-2: Angiopoyetinas 1 y 2, respectivamente.

aP2: *adipocyte Protein 2*; Proteína adipocitaria 2.

APAF-1: *Apoptotic Protease Activating Factor 1*; Factor 1 activador de proteasas apoptóticas.

APO1: *APoptosis antigen 1*; Antígeno apoptótico 1.

ARN: Ácido Ribonucleico.

BAT-C1: Línea de Células Progenitoras Adipocitarias generadas en el NIH, cuya diferenciación espontánea se dirige hacia el linaje marrón.

BCL-2: *Beta-Cell Lymphoma 2*; Linfoma de células beta tipo 2.

BSA: *Bovine Serum Albumin*; Albúmina Sérica Bovina.

C/EBP: *CCAAT Enhancer Binding Protein*; CCAAT Proteína Promotora de Enlace.

C57BL6: Cepa de Ratones Provenientes del Laboratorio Jackson, USA. Son de color negro, de allí su fragmento acrónimo “BL” (*Black*).

CONEA: Comisión Nacional de Energía Atómica.

COUPE-TF1/NR2F1: *Chicken Ovalbumin UPstream promotEr Transcription Factor 1 / Nuclear Receptor subfamily 2, group F, member 1*; Factor de transcripción 1 promotor corriente arriba de la ovoalbúmina gallinácea / Receptor Nuclear de la subfamilia 2, grupo F, miembro 1.

CPA: Células Progenitoras Adipocitarias.

DEPC: DiEtildipiroCarbamato.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Medio de Eagle modificado por Dulbecco.

dNTPs: *deoxyNucleoside TriPhosphates*; desoxiNucleótidos Trifosfatados.

DR3-6: *Death Receptor 3-6*; Receptor de muerte 3-6.

DTT: DiTioTreitol.

EDTA: *EtilenDiaminTetraAcetic acid*; Ácido EtilenDiaminTetraAcético.

EEM: Error Estándar de la Media.

EMAG: Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos.

ENFR: Encuesta Nacional de Factores de Riesgo.

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*; Citometría de flujo activada por fluorescencia.

Fas: *Fragment Apoptotic Signalling*; Fragmento señalizador de la apoptosis.

FEV: Fracción Estroma Vasular.

FGF: *Fibroblast Growth Factor*; Factor de crecimiento fibroblástico.

FITC: *Fluorescein IsoThioCyanate*; Isotiocianato de Fluoresceína.

FSC: *Forward Scatter*; Dispersión Frontal.

GABA: *Gamma Amino Butiric Acid*; Ácido Gamma amino butírico.

GLUT4: *GLUcose Transporter 4*; Transportador transmembrana de glucosa tipo 4.

HIF1 $\alpha$ : *Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$* ; Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ .

IAP: *Inhibitory Apoptotic Proteins*; Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis.

IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1*; Factor de crecimiento insulinosímil 1.

IL-2: Interleukina 2.

IL-6: Interleukina 6.

IMBICE: Insitute Multidisciplinario de Biología CELular.

IMC: Índice de masa corporal.

JAK: *Janus Kinase*; Kinasa Janus.

KLFs: *Krüppel-like factors* ; Factores similares a Krüppel.

LPL: Lipoproteinlipasa.

MDAD: MalonDiAlDehído.

NEFA: *Non Esterified Fatty Acid*; Ácidos grasos no esterificados.

NIH: *National Institute of Health* ; Instituto Nacional de Salud (USA).

Ob/Ob: Especie homocigótica para la ausencia de leptina.

Omi/HtrA2: *High temperature requirement A2*; Proteína A2 de la familia de proteasas de alta temperatura.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAI-1: *Plasminogen Activator Inhibitor 1*; Inhibidor del Activador del Plasminógeno 1.

PBS: *Phosphate Buffered Saline*; Buffer Fosfato Salino.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; Reacción en cadena de la polimerasa.

PE: *Phicoerythrine*; Ficoeritrina.

PECAM: *Platelet endothelial cell adhesion molecule*; Molécula de adhesión de células endoteliales hacia las plaquetas.

PEPCK: *PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase*; Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa.

POMC: Proopiomelanocortínico.

PPAR $\gamma$ : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$* ; Receptor Activado por Proliferación Peroxisómica  $\gamma$ .

PPRE: *PPar Response Elements*; Elementos de Respuesta al PPAR.

Pref-1: *Preadipocyte Factor 1*; Factor Preadipocitario 1.

PTPRC: *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C*; Receptor tipo C de la proteína Tirosinfosfatasa.

PUFA: *PolyUnsaturated Fatty Acids*; Ácidos Grasos Poliinsaturados.

RIA: RadioInmunoAnálisis.

RXR: *Retinoid X Receptor*; Receptor Retinoide X.

SMAC/DIABLO: *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAp Binding protein with LOw pI*; Segundo activador de Caspasas derivado de mitocondria/Proteína enlazadora directa de IAp con Bajo pI.

SMAD: Abreviatura de SMA/MAD *homology*. (Homología con los genes de fenotipo *small* de *C. elegans* y/o con los de *Drosophila* llamados *Mothers Against Decapentaplegic* - Madres contra decapentaplégicos-).

SSC: *Side Scatter*; Dispersión Lateral.

STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*; Transductores de señal y activadores de la transcripción.

TAB: Tejido Adiposo Blanco.

TAV: Tejido Adiposo Visceral.

TBARS: *ThioBarbituric Acid Reactive Substances*; Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TGF: *Transforming Growth Factor*; Factor de crecimiento transformante.

TNF1R: *Tumor Necrosis Factor 1 Receptor*; Receptor 1 del factor de necrosis tumoral.

TNF- $\alpha$ : *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ; Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ .

tPA: *tisular Plasminogen Activator*; Activador del Plasminógeno tisular.

TR: Transcripción Reversa.

TRAIL: *TNF Related Apoptosis Induced Ligand*; Ligando inducido por apoptosis relacionado con TNF.

TZD: Tiazolidinedionas.

UNLP: Universidad Nacional de La Plata.

uPA: *urokinase Plasminogen Activator*; Activador del Plasminógeno uroquinasa.

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; Factor de crecimiento vascular endotelial.

Wnt: El sustantivo Wnt es un acrónimo de *Wg* e *int*: “*Wingless-related integration site*”; Sitio de integración relacionado sin alas.

Zfp423: *Zinc finger protein 423*; Proteína dedo de Zinc 423.

## INTRODUCCIÓN

### **Breve historia del sobrepeso**

La acumulación de tejido adiposo, así como el crecimiento del vello corporal y el desarrollo de ciertas piezas dentales (caninos), son claros ejemplos de mecanismos adaptativos de nuestra especie que sirvieron para mejorar la supervivencia y son cada vez más afectados por conductas propias de nuestra civilización. En el caso de los dos últimos ejemplos, su reemplazo por la ropa y el uso de cubiertos respectivamente, no representa mayores inconvenientes, pero el primero motiva continuos estudios, ya que nuestros cuerpos actualmente parecen enfrentarse a un “conflicto de intereses”. Por un lado, su naturaleza los involucra en la regulación del apetito (principalmente saciedad) y les indica que, de haber excedente energético, lo almacenen como grasa para futuros períodos de escasez que podrían amenazar la supervivencia. Por otro lado, nuestra realidad sociocultural hace que esta amenaza (salvo por motivos económicos), sea prácticamente inexistente. A este conflicto básico podemos sumar múltiples factores, tales como el hecho de no necesitar más de la caza para proveer el alimento, previniendo el azar de la ingesta y el gasto energético que requeriría realizarla. Lo mismo puede decirse de nuestra forma de traslado: la marcha ha sido reemplazada por el desplazamiento vehicular, disminuyendo el consumo de energía. A ello se agrega la disminución de nuestro período de sueño, que según recientes investigaciones, implica disminuir su efecto anti-inflamatorio (Cano Barquilla *et al.*, 2014) y protector del desarrollo del síndrome metabólico. Complementariamente, los alimentos disponibles son cada vez más concentrados en grasas y azúcares y con menor contenido de fibra, proteínas y vitaminas. El conjunto de todos estos factores ha llevado a algunos autores a considerar nuestro ambiente actual como un ambiente **obesogénico** (Chaput *et al.*, 2011), con amplia oferta y disponibilidad de alimentos altamente calóricos e insuficiente actividad física y descanso. Sin embargo, esto no ha sido así a lo largo de la historia.

Pocas pruebas poseemos sobre lo que ocurría con nuestros lejanos antepasados, excepto por ciertas representaciones heredadas: las denominadas “Venus paleolíticas” (Sarría, 2007), como la Venus de Willendorf (que data del 20.000 A.C.) o la Venus de Dolní Věstonice (25.000 A.C.) son figuras femeninas talladas en piedra que muestran un notorio sobrepeso/obesidad. Esto hace tentador especular que dicho sobrepeso fuera una

simbología para representar e invocar abundancia, justamente en algo vital y escaso en esa época como era el alimento (Bray, 1990).

El advenimiento de la civilización griega provocaría un cambio conceptual: Hipócrates observó que “la muerte súbita era más frecuente en los obesos que en los delgados” (Williams, 2003). También que la obesidad es una causa de infertilidad femenina y de alteraciones del ciclo menstrual (Salas Salvadó *et al.*, 2005). De este modo, fue el primero en asociar la obesidad y la muerte súbita hace más de 2000 años (Basilio Moreno *et al.*, 2000) y probablemente algunas de sus deducciones sigan siendo válidas.

Pero pese a su renombre, y al respaldo otorgado a sus ideas por la Iglesia Católica, las teorías de Hipócrates no prevendrían la glotonería observada durante toda la Edad Media y la Edad Moderna entre los nobles y los de alto linaje. Esto se debía fundamentalmente a que el sobrepeso/obesidad era considerado como un signo tangible de bienestar, y una forma de ostentar poder. De allí las imágenes que los artistas plasmaban como atractivas (por ejemplo, la “Venus y cupido” del pintor flamenco Paul Rubens o la “Venus y Adonis” de Tiziano Vecellio). Por su parte, la iglesia desaprobaba la glotonería; y la adjudicó como uno de los pecados capitales (gula).



**Figura 1:** Peter Paul Rubens - Venus y Cupido; Museo Thyssen-Bornemisza, Madrid

En la era Contemporánea, más precisamente en el siglo XX, comienzan a perfilarse teorías científicamente más sólidas y la obesidad comienza clasificarse en endógena o exógena,



según predominaran los factores genéticos o el exceso de ingesta y el sedentarismo, respectivamente. Al mismo tiempo se identifican las características de algunos tipos especiales de obesidad, sobre todo de tipo hormonal (síndrome de Cushing, hipotiroidismo), y comienza a hacerse foco en el estudio del tejido adiposo.

### Concepto actual de obesidad

La palabra “obeso” proviene del latín “*obedere*”, formado de las raíces *ob* (sobre, o que abarca todo) y *edere* (comer), que se podría traducir literalmente como “se lo come todo”. El término fue acuñado por el médico británico Noha Biggs, y utilizado por primera vez en 1651 en su libro “*Medical Practitioner and Social Reformer*”.

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su Nota descriptiva número 311 (enero de 2015), define al sobrepeso y a la obesidad como “una acumulación anormal o excesiva de **grasa** que puede ser perjudicial para la salud”. Para diferenciar entre ellas, utiliza el criterio del índice de masa corporal (IMC), basado en medidas fáciles y rápidas de obtener. Se calcula dividiendo el peso de la persona en kilos por el cuadrado de su altura en metros (kg/m<sup>2</sup>). Así, un IMC  $\geq 25$  determina sobrepeso; mientras que uno  $\geq 30$  determina obesidad. Naturalmente, la obesidad posee diferentes grados y las diferencias entre ellos y el riesgo cardiovascular asociado a cada uno de ellos se detallan a continuación.

Denominación	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Riesgo cardiovascular
Peso normal	18,5 a 24,9	Promedio
Sobrepeso o Pre Obeso	25 a 29,9	AUMENTADO
Obesidad Grado I o moderada	30 a 34,9	AUMENTO MODERADO
Obesidad Grado II o severa	35 a 39,9	AUMENTO SEVERO
Obesidad Grado III o mórbida	$\geq 40$	AUMENTO MUY SEVERO

**Tabla 1:** Indicadores de riesgo cardiovascular según el IMC. Fuente: OMS.

Este indicador proporciona la medida más útil para identificar sobrepeso y obesidad en la población, puesto que es la misma para ambos sexos y para adultos de todas las edades.

### **Perspectiva mundial y argentina**

Según la OMS (datos del año 2014), la Argentina se encuentra entre los países cuyo IMC promedio para varones y mujeres va de 27,5 a 29,9. Al mismo tiempo, la incidencia de sobrepeso ( $\text{IMC} \geq 25$ ) es del 61,7% en ambos sexos, lo cual la ubica en el segmento de países con más incidencia de sobrepeso (los segmentos establecidos por la OMS son 0% a 20%, 20% a 40%, 40% a 60% y  $\geq 60\%$ ).

Según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (ENFR) 3<sup>ra</sup> edición (2013), la situación en Argentina se destaca por lo siguiente:

- 6 de cada 10 personas registran exceso de peso.
- 2 de cada 10 personas registran obesidad.
- En 2013 aumentó un 42,5% la prevalencia de obesidad respecto del 2005 (14,6 vs. 20,8%), con un incremento menos significativo desde 2009.
- La prevalencia de obesidad resultó mayor entre varones y a menor nivel educativo.

A continuación detallamos los principales indicadores relacionados con el síndrome metabólico según la ENFR en los siguientes períodos: 2005, 2009 y 2013.

Ítem encuestado	2005	2009	2013
Actividad física baja	46,2%	54,9%	55,1%
Porciones de frutas o verduras consumidas diariamente	-	2,0	1,9
Exceso de peso (IMC >25) (*)	49,0%	53,4%	57,9%
Sobrepeso (IMC $\geq$ 25 y <30)	34,4%	35,4%	37,1%
Obesidad (IMC $\geq$ 30) (*)	14,6%	18,0%	20,8%
Prevalencia de glucemia elevada/diabetes (población total)	8,4%	9,6%	9,8%
Prevalencia de presión arterial elevada (entre quienes se controlaron)	34,5%	34,8%	34,1%

**Tabla 2:** Resultados de la ENFR (2013). Los valores mostrados con (\*) representan diferencias estadísticamente significativas.

### Tejido adiposo

De la definición de sobrepeso y obesidad de la OMS se desprende la importancia del estudio del tejido adiposo en ambas situaciones. En la actualidad se acepta el papel del tejido adiposo como órgano endocrino, secretor de diferentes hormonas y factores pro-inflamatorios llamadas **adipocitoquinas** (del griego *adipos* “grasa”, *cytos* “célula” y *kinos* “movimiento”). Este concepto ha experimentado variaciones graduales como se describe a continuación.

El primer esbozo (meramente teórico) de la actividad del tejido adiposo como órgano endocrino tuvo lugar en 1948 en un artículo de revisión de Shapiro y Wertheimer, quienes sugirieron que este tejido era capaz de regular el consumo energético a través de factores nerviosos y endocrinos (Wertheimer y Shapiro, 1948). Sin embargo, la evidencia experimental de la misma recién llegó en 1972, cuando en su trabajo pionero, Schindler *et al.* (1972) demostraron que el tejido adiposo humano tiene la capacidad de convertir la androstenediona en estrona. La evidencia desplazó definitivamente la consideración del

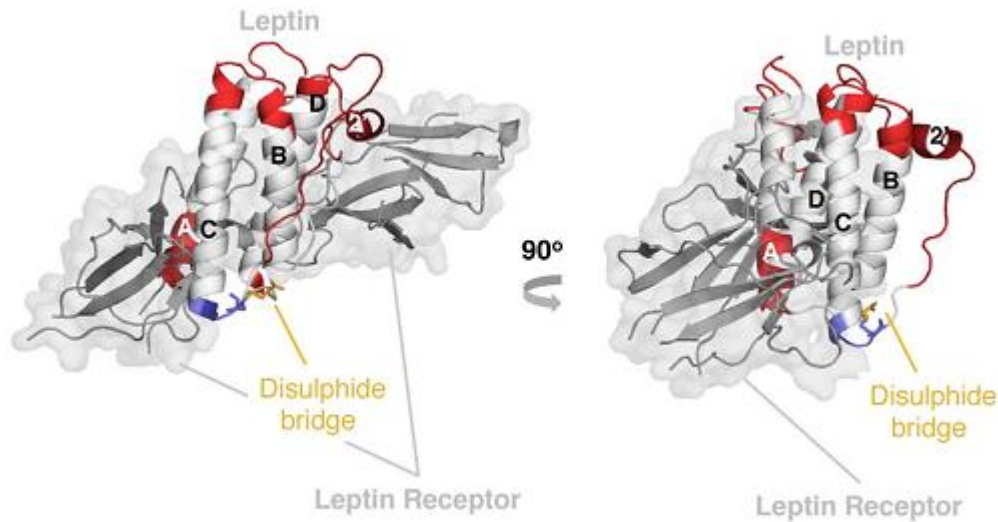
tejido adiposo como reservorio energético pasivo para integrarlo al resto de los tejidos metabólicamente activos y con una clara función endocrina aunque aún sin un papel secretor definido. Recién en 1987 Flier describió la primera proteína secretada al torrente sanguíneo por el tejido adiposo, la **adipsina** (Flier *et al.*, 1987). Dicha molécula, más tarde identificada como factor D perteneciente a la cascada del complemento, estableció definitivamente al tejido adiposo como un tejido secretor, sugiriendo una interdependencia entre el sistema endocrino y el sistema inmunológico.

Sin embargo, el estudio de mayor resonancia en la consideración del tejido adiposo como órgano endocrino se produce en 1994, cuando Jeffrey Friedman luego de varios años de estudios de parabiosis entre ratones normales y genéticamente obesos (Ob/Ob), descubre el producto del gen responsable de dicha obesidad: la **leptina** (Zhang *et al.*, 1994). Un año más tarde el mismo grupo describe que tanto en el ratón como en el humano esta hormona reduce la ingesta alimentaria, el peso corporal y la masa de tejido adiposo (Halaas *et al.*, 1995).

Actualmente se considera al tejido adiposo como un activo órgano endocrino y a sus hormonas como moléculas bioactivas de efectos pleiotrópicos. Entre ellas, cabe destacar:

### **Leptina**

La leptina (del griego *leptos*, “delgado”) es una proteína de 16 KDa, que posee analogía estructural con la familia de las citoquinas helicoidales (como la IL-2 y la IGF-1) y se acepta que posee propiedades pro-inflamatorias (Santos-Álvarez *et al.*, 1999). Está constituida por 167 aminoácidos (incluyendo una secuencia-señal de 21 aminoácidos). Estructuralmente, posee 4 hélices  $\alpha$  y un puente disulfuro entre el residuo C96 y la cistina C terminal, indicado en la figura (tomado de Haglund *et al.*, 2014).



**Figura 2:** Diagrama esquemático tridimensional de la proteína leptina.

Aunque la leptina se expresa en todos los tipos de tejido adiposo, predomina en el tejido adiposo subcutáneo en forma directamente proporcional a su masa y al estado nutricional del sujeto (Fain *et al.*, 2004). Esta hormona regula la homeostasis energética vía regulación de la saciedad y el peso corporal, ejerciendo su influencia a través de tres tipos diferentes de neuronas sensibles a ella: las neuronas que responden al neuropéptido Y, las neuronas GABA (del inglés *γ-aminobutyric acid*) y las neuronas proopiomelanocortínicas (POMC). Las dos primeras son orexígenas, y son inhibidas por la leptina; mientras que la última es anorexígena y es estimulada por la leptina. Esto genera sensación de saciedad y aumento del metabolismo basal (Cowley *et al.*, 2001).

Sin embargo, estudios que compararon los niveles séricos de leptina en pacientes obesos y normales encontraron valores mayores en los primeros (Considine *et al.*, 1996). Esta aparente contradicción se puede explicar considerando la posible resistencia tisular a la leptina. Esta última estaría condicionada por una combinación de problemas de transporte a nivel de la barrera hematoencefálica y de señalización tanto en las neuronas blanco como en las células en general (Kershaw y Flier, 2004).

**Adiponectina**

es una proteína de aproximadamente 30 KDa (Scherer *et al.*, 1995), que tiene la capacidad de formar trímeros y oligómeros estables de alto peso molecular (Ouchi *et al.*, 2003). Presenta niveles relativamente altos en plasma (3 a 30 µg/mL) (Ouchi *et al.*, 2003), y aunque es generada exclusivamente por los adipocitos, sus niveles son inversamente proporcionales al índice de masa corporal (Ryo *et al.*, 2004). Esta última observación, sumada al hecho de que su producción es inhibida tanto por factores pro-inflamatorios como el TNF- $\alpha$  y la IL-6 (Ouchi *et al.*, 2003; Berg y Scherer, 2005), como por la hipoxia y el estrés oxidativo (Hosogai *et al.*, 2007), avalan la consideración del proceso inflamatorio en la constitución y desarrollo del síndrome metabólico.

La adiponectina ejerce sus efectos sobre tejidos tales como el hígado, el músculo esquelético, la pared vascular y el endotelio (Leal y Mafra, 2013). En la pared vascular genera una disminución de la adhesión de monocitos e inhibición de la transformación de macrófagos en células espumosas. El primer efecto lo produce disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión, mientras que el segundo lo logra disminuyendo la expresión de receptores carroñeros (*scavengers*) (Díez e Iglesias, 2003).

Por su parte, en las células endoteliales estimula la generación del óxido nítrico (vasodilatador), y favorece la formación de nuevos vasos (Kershaw y Flier, 2004). Además, disminuye la respuesta inflamatoria generada por TNF- $\alpha$ , inhibiendo el efecto de éste sobre el factor nuclear  $\kappa\beta$  (Leal y Mafra, 2013).

**Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

Es una proteína transmembrana de 26 KDa de peso molecular, que se activa por un clivaje que genera un residuo de 17 KDa (Kershaw y Flier, 2004). Es producida mayormente por monocitos y macrófagos.

Si bien se conocía desde hace tiempo su participación en procesos inflamatorios, el interés sobre ella se incrementó ante la sospecha de su participación activa en el control de la homeostasis energética, ya que es capaz de inducir caquexia *in vivo* (Ruan y Lodish, 2003).

Actúa en forma pleiotrópica: en el tejido adiposo disminuye la captación y almacenamiento de glucosa y ácidos grasos, reprime los genes lipogénicos y altera la expresión de adipoquinas, tales como IL-6 y adiponectina (Ruan *et al.*, 2002). También afecta negativamente la vía de señalización de la insulina (Leal y Mafra, 2013).

### **Interleuquina 6 (IL-6)**

Es una citoquina caracterizada por su capacidad para potenciar y modular la respuesta inmune (Wallenius *et al.*, 2003). Es secretada tanto por los adipocitos maduros como por células de la fracción estroma vascular (FEV), en una proporción del 15% al 35% de su secreción total, respectivamente (Mohamed-Ali *et al.*, 1997).

Los estudios indican que existe una relación directamente proporcional entre la secreción y expresión de IL-6 y el grado de obesidad, tolerancia a la glucosa alterada e insulinoresistencia (Fernández-Real y Ricart 2003).

### **Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)**

Es una glicoproteína de 45 KDa que se expresa principalmente en hepatocitos y células endoteliales (Leal y Mafra, 2013). Al ser antagonista de los dos activadores conocidos (activador del plasminógeno uroquinasa [uPA] y plasminógeno tisular [tPA]), inhibe la fibrinólisis. Esta inhibición lo convierte en un factor de riesgo cardiovascular (Correia y Haynes, 2006). Además, varios trabajos lo relacionan con los procesos angiogénicos y aterogénicos, así como también con el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina (Kershaw y Flier, 2004).

A pesar de que las células anteriormente mencionadas representan una fuente de PAI-1, éste también es sintetizado y liberado por células de la fracción estroma vascular del tejido adiposo blanco (TAB), siendo mayor su expresión en el TAB visceral que en el subcutáneo (Fain *et al.*, 2004).

### **Quemerina**

Recientemente identificada como adipoquina (Bozaoglu *et al.*, 2007), la quemerina (*chemerin*), es la más joven de las adipoquinas descriptas hasta el momento. Si bien se sabe

que posee un rol quimiotáctico para diversas células del sistema inmune (Ernst y Sinal 2010), la gama total de sus efectos no ha sido aún completamente dilucidada. Está claro que su función varía dependiendo de la célula blanco: potencia la vía de señalización de la insulina en los adipocitos, mientras que induce insulinoresistencia en miocitos del músculo esquelético (Leal y Mafra, 2013).

### **Tipos de tejido adiposo**

Además del descubrimiento de la participación endocrina del tejido adiposo, actualmente se estudian los diferentes comportamientos metabólicos de cada depósito adiposo particular. Existe por ejemplo evidencia de que la liposucción de grasa subcutánea a pacientes obesos no revierte la presencia de factores de riesgo cardiovascular ni aumenta la sensibilidad a la insulina del músculo esquelético, hígado y tejido adiposo (Klein *et al.*, 2004); mientras que la omentectomía (eliminación de grasa visceral) mejora el metabolismo de la glucosa en seres humanos (Thörne *et al.*, 2002) y roedores (Barzilai *et al.*, 1999). En el mismo sentido, la eliminación de grasa subcutánea en ratas Zucker (generadoras espontáneas de síndrome metabólico) no genera cambios beneficiosos en el peso corporal, glucemia o insulinemia (Liszka *et al.*, 1998). A la luz de ésta evidencia, el tejido adiposo visceral se configuraría como un depósito perjudicial, asociado con un perfil metabólico adverso, mientras que el tejido adiposo subcutáneo mejoraría la sensibilidad a la insulina y disminuiría el riesgo de desarrollar síndrome metabólico.

Estas diferencias, sin embargo, no parecen deberse únicamente a su diferente localización anatómica, ya que en ratones el trasplante de grasa subcutánea a la región visceral mostró un aumento de la sensibilidad a la insulina y una disminución del peso corporal y de la masa adiposa total (Tran *et al.*, 2008). En este sentido, existe evidencia de una diferencia en el perfil de secreción de adipocinas de cada depósito particular. Así, a diferencia de los depósitos de grasa subcutánea, la grasa visceral se asocia con elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 y leptina, que provocan un estado local y sistémico de inflamación crónica (Maury *et al.*, 2007) e inducen resistencia a la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993). Sin embargo, considerar sólo un perfil de secreción diferencial podría ser una simplificación excesiva de la existencia de un transcriptoma específico para



cada tipo de panículo, que sería mucho más complejo y dé origen a respuestas metabólicas diferentes.

En este sentido, estudios de perfil genético (*gene array profiling*) en adipocitos humanos y murinos aislados de diferentes panículos de grasa blanca, han demostrado la participación de genes del desarrollo en la formación del tejido adiposo subcutáneo y visceral (Tchkonia *et al.*, 2007). Los genes involucrados incluyen numerosos factores de transcripción que participan en la organogénesis, incluidos los miembros de *homeobox* (Hox) y familias de receptores nucleares de factores de transcripción (Gesta *et al.*, 2006) (por ejemplo COUPE-TF1/NR2F1). Estos hallazgos sugieren que los adipocitos de diferentes depósitos de grasa blanca se originan a partir de diferentes precursores y mantienen su perfil transcripcional durante su desarrollo. Apoyan esta hipótesis la demostración de que CPAs humanas inmortalizadas aisladas del panículo omental y subcutáneo de diferentes donantes, respetaron su expresión de genes de desarrollo durante sucesivas generaciones celulares. Dicha expresión comprende aproximadamente el 18% de la expresión genética total adipocitaria (Tchkonia *et al.*, 2007).

De las adipoquinas secretadas diferencialmente, la adiponectina destaca por presentar niveles de secreción muy superiores en el tejido adiposo subcutáneo respecto al visceral, y por ser un marcador establecido de la sensibilidad a la insulina (Trujillo *et al.*, 2005). En un modelo de ratones Ob/Ob que sobreexpresan adiponectina se encontró un aumento masivo de tejido adiposo subcutáneo, y esta “obesidad subcutánea” fue asociada con una mejor sensibilidad a la insulina, un mayor tasa de metabolismo lipídico (*clearance*) y una mejora de la función de células  $\beta$  (Kim (2) *et al.*, 2005).

Es de destacar que el aumento de la adiponectina podría estar mediado por el PPAR $\gamma$ , siendo éste el principal mecanismo de sensibilidad a la insulina que presenta el tejido adiposo subcutáneo. Coincidentemente, ella es la base del efecto farmacológico de las tiazolidinedionas (TZD), fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina (Nawrocki *et al.*, 2006). Las diferencias en la expresión de PPAR $\gamma$  pueden contribuir causalmente a la formación de depósitos de grasa específicos, ya que el deterioro de la transcripción de PPAR $\gamma$ 2 observada en pacientes con polimorfismo de PPAR $\gamma$ 2 conocido como Pro12Ala (P12A) (Heikkinen *et al.*, 2009), se asocia a sobrepeso con pérdida de tejido adiposo

subcutáneo, junto con resistencia a la insulina, y otras disfunciones metabólicas. Asimismo, el tratamiento de roedores y humanos con agonistas de PPAR $\gamma$  aumenta la formación de depósitos subcutáneos de grasa (Laplane *et al.*, 2006), lo que refuerza el papel regulador de este factor de transcripción en la formación de tejido adiposo. En este mismo sentido, la obesidad abdominal inducida en seres humanos por sobrealimentación, también se asocia con disminución de la expresión de PPAR $\gamma$  (Tchoukalova *et al.*, 2010).

Al igual que el PPAR $\gamma$ , el C/EBP $\alpha$  también se expresa preferentemente en tejido adiposo subcutáneo (Tchkonia *et al.*, 2006), donde contribuye al aumento de la activación de PPAR $\gamma$ . La compleja relación entre C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  en la inducción de PPAR $\gamma$  se demostró en modelos de ratón que no expresan C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ . Mientras que los fibroblastos embrionarios aislados de estos ratones no fueron capaces de expresar PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , la muy pequeña cantidad aislable de tejido adiposo de estos ratones expresó tanto PPAR $\gamma$  como C/EBP $\alpha$  (Tanaka *et al.*, 1997). Esta observación supone la presencia de una o varias vías alternativas que inducirían PPAR $\gamma$  en diferentes depósitos de tejido adiposo blanco.

## **Adipogénesis**

### **Primeros conceptos**

El estudio del desarrollo del tejido adiposo comenzó en 1940, con la implantación de cámaras traslúcidas en las orejas de conejos en las que se podía estudiar el desarrollo de dicho tejido (Clark y Clark, 1940). Sus resultados demostraron que los nuevos adipocitos aparecían sólo a lo largo de la vasculatura, y concordaban con otros descriptos previamente (Coats, 1883), que vinculaban la vascularización con la formación del tejido adiposo. En conjunto, ellos anticiparon el concepto actual de que las células progenitoras adipocitarias residen en el nicho perivascular (Lin *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008).

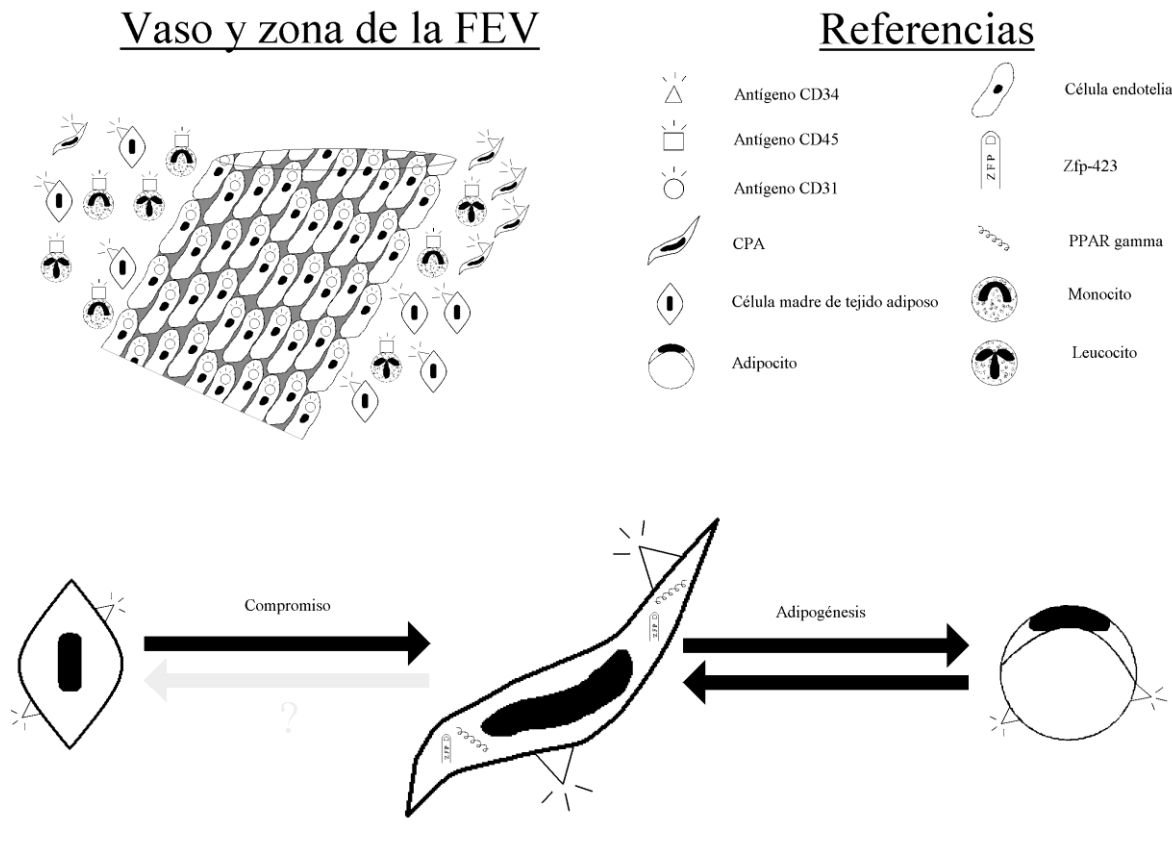
Estudios posteriores confirmaron la existencia de una población de células mitóticamente activas en el tejido (Hellman y Hellerstrom, 1961) y que la expansión de dicho tejido se asocia con aumento del ADN total y del número de adipocitos (Peckham *et al.*, 1962). Tras el desarrollo de la técnica de digestión con collagenasa y separación de adipocitos de las

células de la fracción estroma vascular Rodbell (1964) y Hollenberg y Vost (1969) determinaron la fuente de estos nuevos adipocitos utilizando timidina tritiada. Ellos lograron detectar un aumento progresivo de la radiactividad en células de la fracción estroma vascular hacia los adipocitos, infiriendo la presencia de precursores adipocitarios en dicha fracción. Poco después aparecieron estudios que demostraron el crecimiento de células con morfología similar a fibroblastos, que estaban presentes en la fracción estroma vascular y que poseían potencial adipogénico (Ng *et al.*, 1971), a los que se denominó “preadipocitos primarios”.

### **Conceptos actuales**

Uno de los primeros eventos que suceden en la aparición de la obesidad es el desarrollo del tejido adiposo. Este órgano sorprende por su capacidad de expansión y contracción en respuesta a alteraciones del balance energético: mientras que en atletas muy delgados representa un 5% del peso corporal (Fleck, 1983), en personas con obesidad mórbida puede llegar hasta al 60% (Ortega *et al.*, 2010). Este sorprendente grado de plasticidad requiere de una concomitante capacidad hipertrófica e hiperplásica (Bertrand *et al.*, 1978), que esté estrictamente regulada en función de los requerimientos del organismo, teniendo en cuenta además que en el tejido adiposo de adultos normales la tasa de renovación celular es sólo del 10% anual (Spalding *et al.*, 2008).

El proceso de adipogénesis está representado en la figura de la página siguiente.



**Figura 3:** Esquema del proceso adipogénico y su localización *in vivo*.

Como se aprecia en ella, las células madre son una subpoblación de las células que se encuentran en la fracción estroma vascular. Ellas pueden dar origen a múltiples linajes, como miocitos, osteoblastos, condrocitos y, en condiciones experimentales, hasta células  $\beta$  y miocardiocitos. Pero cuando se determinan hacia el linaje adipocitario se origina el **compromiso adipocitario** (Cristancho *et al.*, 2011), aumentando ciertos marcadores génicos (básicamente Zfp423 y Ppar $\gamma$ ), sin mediar cambio en los tres antígenos de superficie evaluados en éste trabajo (CD34+, CD31- y CD45-). Éstas células reciben actualmente la denominación de **células progenitoras adipocitarias** (CPA).

El proceso de adipogénesis es promovido por varios factores de transcripción, tales como ZFP423, CEBP $\alpha$ , CEBP $\beta$ , CEBP $\delta$  y el regulador principal, PPAR $\gamma$  (Yoon *et al.*, 2013). Intentando dilucidar los mecanismos subyacentes a este proceso, el grupo del Dr Spiegelman (Gupta *et al.*, 2010) demostró convincentemente que la expresión ectópica del factor de transcripción ZFP423 (su análogo humano es ZNF423), es necesaria y suficiente

para rescatar la expresión de PPAR $\gamma$ 2 y con ello conducir a la adipogénesis en células NIH-3T3. Esta vía parece saltar a los C/EBPs, KLFs y otros inductores de PPAR $\gamma$  conocidos. Sorprendentemente, la expresión de PPAR $\gamma$ 1 no se ve modificada en presencia de ZFP423. Aunque todavía no se conoce con precisión el mecanismo por el cual ZFP423 regularía a PPAR $\gamma$ 2, está claro que la proteína morfogenética ósea activa PPAR $\gamma$ 2 en la adipogénesis mediante su interacción con ZFP423/SMAD.

Estimar la contribución de ZFP423 a la regulación de PPAR $\gamma$  *in vivo* es problemática, ya que los ratones ZFP423  $-/-$  poseen una altísima letalidad. Sin embargo, las observaciones logradas demostraron menor número de adipocitos en el embrión mutado respecto al control (Gupta *et al.*, 2010). Hasta el momento, Zfp423 parece ser una poderosa vía alternativa para la regulación de PPAR $\gamma$ . Esta potente función plantea preguntas acerca de los mecanismos que controlan la expresión de este factor de transcripción y la contribución de esta vía a la inducción de PPAR $\gamma$  en los depósitos de grasa.

Aún cuando existen muchos participantes en el proceso adipogénico, el PPAR $\gamma$  es sin dudas el regulador maestro de la adipogénesis. La proteína PPAR $\gamma$  es uno de los tres miembros existentes en la familia PPAR de receptores nucleares (PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$ ), y su abreviatura proviene de *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (Receptor activado por proliferación peroxisómica). Dicho nombre deriva de una propiedad observada en el primer integrante descubierto (PPAR $\alpha$ ) de responder a varios compuestos que inducen proliferación peroxisómica. Sin embargo, esta función no es compartida por los otros miembros de la familia (incluido el PPAR $\gamma$ ).

Como proteína posee dominios que se encuentran en casi todos los receptores hormonales nucleares. Para lograr una correcta interacción con el ADN requiere formar un heterodímero con RXR (Receptor X Retinoico; Kliewer *et al.*, 1992). Presenta dos variantes que se forman debido al uso de dos promotores diferentes, que agregan (o no) un primer exon alternativo y reciben las denominaciones de PPAR $\gamma$  2 y 1, respectivamente. En el caso del PPAR $\gamma$ 2, la proteína posee 30 aminoácidos extra en su extremo N-terminal y es expresada más selectivamente por el tejido adiposo (Tontonoz *et al.*, 1994).

La mayoría de los estudios publicados demuestran que una pérdida de función del PPAR $\gamma$  tanto *in vivo* como *in vitro*, implica una pérdida del potencial adipogénico. En este sentido, Rosen *et al.* (1999) demostraron que células precursoras con PPAR $\gamma$  anulado genéticamente (PPAR $\gamma$ -null), no contribuyen a la generación de adipocitos en ratones quiméricos receptores; sin embargo son capaces de dar origen a otros linajes celulares. Igual resultado se obtuvo empleando precursores embrionarios derivados de fetos con el PPAR $\gamma$  anulado genéticamente, que no logran adipogénesis *in vitro* (Rosen *et al.*, 2002; Kubota *et al.*, 1999). Finalmente, las mutaciones humanas en el gen del PPAR $\gamma$  demuestran que este factor es crucial para el normal desarrollo y función del tejido adiposo humano (Barroso *et al.*, 1999). Más específicamente, el *knockdown* selectivo de PPAR $\gamma$ 2 disminuye drásticamente la adipogénesis (Ren *et al.*, 2002); también existe evidencia de que el PPAR $\gamma$ 1 posee acción adipogénica, aunque en un grado considerablemente menor (Rosen *et al.*, 2002).

Si bien la proteína PPAR $\gamma$  es fundamental en la regulación de la adipogénesis, no es la primera en ser activada. Según modelos corroborados en líneas celulares (Wu *et al.*, 1996) estímulos como la dexametasona y el IBMX (IsoButilMetilXantina), producen una estimulación de CEBP $\delta$  y CEBP $\beta$ , respectivamente, que a su vez activan al PPAR $\gamma$ . Éste, por activación de ligando, induce varios genes diana implicados en la lipogénesis y adipogénesis, y también estimula la expresión de C/EBP $\alpha$ . C/EBP $\alpha$  puede por sí mismo enlazar con el sitio activo en el promotor de PPAR $\gamma$ , proporcionando un ciclo estable de retroalimentación positiva. La expresión de PPAR $\gamma$  en células que carecen de C/EBP $\alpha$  lleva a un nivel de adipogénesis normal. Por el contrario, sin el aporte de PPAR $\gamma$  el C/EBP $\alpha$  no es capaz de promover la adipogénesis (Ren *et al.*, 2002). Sin embargo, adipocitos formados a través de la activación de PPAR $\gamma$  en células deficientes en C/EBP $\alpha$ , muestran una sensibilidad a la insulina anormalmente baja, por lo que resulta evidente que el C/EBP $\alpha$  contribuye al pleno desarrollo del fenotipo adiposo, más allá del mantenimiento de los niveles de PPAR $\gamma$  (Wu *et al.*, 1999). Las regiones reguladoras de un gran número de genes que juegan un papel importante en la lipogénesis y la sensibilidad a la insulina, contienen sitios de unión para PPAR $\gamma$ , incluyendo aP2, PEPCK, LPL, adiponectina, y Glut4. Generalmente, estos elementos de respuesta al PPAR (PPREs, de sus siglas en inglés) se

encuentran en regiones activadoras corriente arriba (*upstream*), en lugar de promotores locales (Tontonoz *et al.*, 1994).

Se cree que la activación de estos genes en el tejido adiposo blanco, mejora su capacidad para almacenar ácidos grasos dietarios. Estos genes incluyen aP2, LPL, CD36, proteína transportadora de ácidos grasos, PEPCCK, y el transportador de glicerol acuaporina 7 (Tontonoz *et al.*, 1994). Como resultado, los ácidos grasos son incluidos en el tejido adiposo y no están disponibles para acumularse en tejidos en los que pudieran generar efectos perjudiciales. De acuerdo con ello, las TZD disminuyen efectivamente los niveles de ácidos grasos circulantes (Boden *et al.*, 2005) y al mismo tiempo, promueven su depósito preferentemente en el tejido adiposo subcutáneo más que en el visceral (Mori *et al.*, 1999)

Coincidente con su capacidad para promover adipogénesis en células en cultivo, los agonistas de PPAR $\gamma$  también aumentan la masa de tejido adiposo *in vivo*. En los roedores, esto es particularmente observable en los panículos adiposos marrones, pero también en los blancos (Tai *et al.*, 1996). En lugar de generar hipertrofia adipocitaria, la activación de PPAR $\gamma$  *in vivo* se asocia con un cambio hacia adipocitos más pequeños, sensibles a la insulina y sin cambio en la masa total de tejido adiposo; estos adipocitos provendrían de la diferenciación *de novo* (Okuno *et al.*, 1998).

### **Balance entre mecanismos de hipertrofia e hiperplasia durante la expansión del tejido adiposo.**

El crecimiento del tejido adiposo es un proceso biológico estrechamente regulado, ya que tanto el exceso (sobrepeso y obesidad) como la ausencia parcial o total de tejido adiposo (lipodistrofias), se asocian a trastornos metabólicos. Ante situaciones de balance energético positivo, la masa final de tejido adiposo está determinada por el equilibrio entre dos mecanismos: la hipertrofia (aumento del tamaño celular) y la hiperplasia (aumento del número de células) (Arner *et al.*, 2010). Dichos procesos están relacionados fisiológicamente con la edad del individuo, de modo que el **número** de adipocitos aumenta naturalmente después del nacimiento y durante la adolescencia (por ello la importancia de estos períodos en el desarrollo posterior del exceso de peso/obesidad). Ya en la edad adulta,

el crecimiento del tejido adiposo se basa principalmente en la **hipertrofia adipocitaria** (Spalding *et al.*, 2008). Así también sucede en situaciones de obesidad, donde la hipertrofia es el principal contribuyente a la ampliación de tejido adiposo con el fin de satisfacer la necesidad de acumular energía, ya que ofrece una respuesta inmediata. La hiperplasia contribuye en menor medida a este aumento, ya que se producen pequeñas células con baja capacidad de almacenamiento de lípidos, y demora más tiempo (Heinonen *et al.*, 2014). No obstante, éste último puede considerárselo como un proceso más benigno, ya que no conlleva inflamación. Por su parte, la hipertrofia se asocia con un aumento del volumen de los adipocitos, un concomitante deterioro de la función mitocondrial y cambios en proteínas de la membrana, así como una mayor muerte celular e inflamación. Todo esto contribuye al desarrollo de trastornos metabólicos asociados a la obesidad (Heinonen *et al.*, 2014) como por ejemplo la elevación del riesgo cardiovascular (Hoffstedt *et al.*, 2010), cambios en el perfil de metabolitos circulantes y composición de ácidos grasos del tejido adiposo visceral (Fariña *et al.*, 2013). También se ha documentado su impacto sobre las CPAs empleando un modelo de dieta rica en fructosa (Zubiría *et al.*, 2013).

Se han descrito casos de personas que responden al balance energético positivo con hiperplasia, dando como resultado un fenotipo obeso “saludable” (Heinonen *et al.*, 2014). La hiperplasia de ambas localizaciones, visceral y subcutánea, parece proteger al individuo de la acumulación ectópica de lípidos, así como de su dismetabolismo y alteraciones metabólicas relacionadas con la glucosa e insulina en la obesidad (Hoffstedt *et al.*, 2010). Es importante destacar que hay estudios clínicos que demuestran que la pérdida de peso disminuye el tamaño adipocitario pero no su número (Spalding *et al.*, 2008). Como contracara, la obesidad y la diabetes tipo 2 asociada a la obesidad suelen presentar **hipertrofia e hipoplasia** adipocitarias, debido a una menor competencia adipogénica de las CPAs (van Tienen *et al.*, 2011).

#### **Procesos de muerte celular adipocitaria: apoptosis y autofagia.**

Ambas formas de muerte celular programada, la apoptosis y la autofagia, se encuentran presentes en el tejido adiposo y se incrementan en personas obesas. La apoptosis, o muerte celular de tipo I, se puede identificar por características morfológicas y bioquímicas, incluyendo la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina (picnosis), la



formación de vesículas en la membrana, la fragmentación del ADN nuclear (cariorrhexis), y la formación de cuerpos apoptóticos (Cinti *et al.*, 2005). En éste proceso, las caspasas (una familia de proteasas específicas) juegan un papel clave como moléculas efectoras. La autofagia, o muerte celular tipo II, se caracteriza por el secuestro de organelas y proteínas citosólicos en vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, que se translocan a los lisosomas para fusionarse con ellos y degradar su contenido (Singh R., 2012). Se necesitan proteínas codificadas por sus genes específicos para la formación de autofagosomas.

**Apoptosis adipocitaria.** El proceso de apoptosis se puede activar a través de dos mecanismos principales: 1) la estimulación de receptores de muerte de la membrana plasmática (**vía extrínseca**) y 2) induciendo la liberación de citocromo c y otras proteínas mitocondriales (**vía intrínseca**).

La **vía extrínseca** de la apoptosis es iniciada por la estimulación de receptores de muerte de la superfamilia de receptores de TNF, tales como el receptor de TNF 1 (TNFR1), CD95 (APO-1 / Fas), o receptor de muerte 3-6 (DR3-6), durante la expansión patológica de tejido adiposo en obesidad (Herold *et al.*, 2013). La presencia de sus ligandos, a saber, TNF $\alpha$ , ligando Fas (Fas-L o CD95-L), o el ligando inducido por apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) en el tejido adiposo, se debe a su síntesis por parte de los adipocitos y la infiltración de macrófagos activos. El TNF $\alpha$  se encuentra sobreexpresado en el tejido adiposo de individuos obesos y constituye un regulador de la apoptosis en adipocitos blancos y marrones (Hotamisligil *et al.*, 1993). Tras la unión a TNFR1, el TNF $\alpha$  cliva (y de este modo activa) a la caspasa-8, que a su vez activa a la caspasa-3 y lleva finalmente a la muerte adipocitaria. Otros ligandos de receptores de muerte, tales como FAS-L o TRAIL, también están asociados con la obesidad y relacionados con la apoptosis de adipocitos (Alkhoury *et al.*, 2010).

La **vía intrínseca** o mitocondrial es desencadenada por la liberación de varias proteínas mitocondriales, tales como el citocromo c, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, o endonucleasa G, desde el espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma (Wang *et al.*, 2009). El citocromo c liberado se une y oligomeriza a la proteína citosólica Apaf-1 para facilitar la formación del apoptosoma. El apoptosoma recluta y activa la procaspasa-9 a través de

Apaf-1, que escinde y activa a los efectores caspasa-3 y caspasa-7. Por otro lado, Smac/Diablo y Omi/HtrA2 promueven la activación de la caspasa a través de la neutralización de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) (Wang *et al.*, 2009). La privación de suero, los ácidos grasos de cadena media como el octanoato y el decanoato, el resveratrol, o las tiazolidinedionas son iniciadores de apoptosis a través de ésta vía en los adipocitos (Xiao *et al.*, 2010). La obesidad está asociada con la activación tanto de la vías extrínseca como intrínseca de la apoptosis adipocitaria (Wang *et al.*, 2009).

### **Identificación y caracterización de Células Progenitoras Adipocitarias**

No es sencillo caracterizar e identificar fehacientemente a las CPAs. La bibliografía correspondiente es confusa a veces, ya sea porque los autores no detallan con precisión las células objeto del trabajo (células FEV en general o subpoblación de ellas; células frescas o con uno o dos días de estabilización en cultivo) o por cambios de la nomenclatura de las mismas (se las comenzó llamando “preadipocitos primarios” para luego pasar a “preadipocitos” y más recientemente a células progenitoras adipocitarias).

La estrategia técnica de realización más frecuente es el análisis de marcadores de superficie celular (ya sea por inmunohistoquímica o más recientemente por citometría de flujo); aunque tampoco hay pleno consenso en cuáles hay que buscar. Yoshimura *et al.* (2006) propone que dichas células son CD34+, CD31-, CD45-, CD90+, CD105- y CD146-, mientras que Lin *et al.* (2010) sugiere que son CD34+, CD31-, CD104b- y negativas para  $\alpha$  actina de músculo liso. Por su parte, Quirici *et al.* (2010) sostiene que son CD34+ y CD271+. Además de esta disparidad de criterios, hay evidencia de que los marcadores atenúan su expresión a medida que transcurren los días de cultivo (Yoshimura *et al.*, 2006; McIntosh *et al.*, 2006).

Para los análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia, se siguió un criterio de triple inmunotinción, según los siguientes fundamentos:

- Dado que la expresión de CD34 es variable en las células madre de tejido adiposo pero estable en los preadipocitos comprometidos (Nielsen *et al.*, 2008), se utilizó éste marcador para evidenciar su presencia. Se piensa que el cambio de expresión de CD34

que implica el compromiso preadipocitario, retroalimenta positivamente éste evento promoviendo la migración de nuevas células madre desde la túnica media a la adventicia de las venas (Lin *et al.*, 2008).

- Se utilizó un marcador (PECAM- o CD31-) cuya ausencia determina que las células identificadas no son endoteliales ni células sanguíneas (Privratsky *et al.*, 2014). Es interesante destacar que las células endoteliales humanas en cultivo tienen la capacidad de reducir la adipogénesis (Rajashekhar *et al.*, 2008) porque secretan ligandos Wnt, que son inhibidores conocidos de la diferenciación tanto de tejido adiposo marrón como blanco.
- Se utilizó un marcador (CD45- o PTPRC-) cuya ausencia descarta que las células identificadas pertenezcan al linaje hematopoyético o sean glóbulos blancos (Yoshimura *et al.*, 2006).

### **Compromiso preadipocitario**

De los tres marcadores mencionados, el que define el compromiso hacia el linaje adiposo es CD34. La familia CD34 (compuesta de CD34, podocalixina y endoglicano), comprende glicoproteínas transmembranarias simples de la familia de las sialomucinas que están relacionadas con la adhesión celular y los procesos de proliferación, migración y diferenciación (Nielsen *et al.*, 2008). Además, este indicador ayuda a discernir entre subpoblaciones celulares de CPAs. Si bien está descrito que hay células FEV CD34- que muestran adipogénesis (Suga *et al.*, 2009), las células positivas para CD34 dan cuenta de alrededor del 82% de la población celular de la FEV (Festy *et al.*, 2005) y está probado (Rodeheffer *et al.*, 2008) que son más adipogénicas *in vitro* que la población CD34- (luego de haberlas seleccionado en función de CD31). Además, los adipocitos aislados de tejido adiposo blanco son CD34+ (Festy *et al.*, 2005). En consecuencia, la combinación CD34+/CD31- identifica a una población de CPAs con excelente capacidad adipogénica *in vitro* y distingue a los preadipocitos comprometidos *in vivo*.

**Angiogénesis y su relación con el proceso adipogénico**

La angiogénesis normal depende del delicado equilibrio entre factores angiogénicos, como VEGF y angiopoyetinas; y factores angiostáticos, tales como angiostatina y endostatina (Kim *et al.*, 2012). En situaciones de balance energético positivo, los adipocitos producen mitógenos específicos de las células endoteliales y factores angiogénicos que favorecen la formación de vasos. Además, las células endoteliales producen factores de crecimiento y citoquinas que aumentan la adipogénesis y la deposición grasa (Tahergorabi *et al.*, 2012, Soumya *et al.*, 2013). Por lo tanto, adipocitos y células endoteliales interactúan para regular tanto la adipogénesis como la angiogénesis y esta interacción coordina la expansión armónica del lecho capilar y de los panículos adiposos regionales.

De los factores angiogénicos mencionados, el VEGF-A es el más ampliamente estudiado. Diversos estudios demuestran que la supresión adiposo-específica de VEGF-A induce hipoxia, apoptosis, inflamación y anormalidades metabólicas que incluyen resistencia a la insulina e hiperlipidemia (Sung *et al.*, 2013), mientras que su sobreexpresión promueve y mejora la neovascularización y el metabolismo de la glucosa (Elias *et al.*, 2012). Las angiopoyetinas 1 y 2 (Ang-1 y Ang-2) tienen efectos opuestos sobre la estabilización de los vasos. Ang-1 aumenta su estabilidad y la interacción entre las células endoteliales, los pericitos y la matriz extracelular. Ang-1 también conduce a la expresión del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) y de proteínas estructurales tales como integrinas, fibrina y vitronectina (Hemmerlyckx *et al.*, 2010). Por otra parte, la expresión de Ang-2 es estimulada en condiciones de hipoxia y sus receptores se colocan comúnmente con los receptores de VEGF (Bento *et al.*, 2010). Ang-2 es esencial para el crecimiento de los vasos, ya que torna las interacciones celulares más débiles, lo que permite la proliferación y migración inducidas por el VEGF. Sin embargo, la inhibición de VEGF después de la desestabilización celular inducida por Ang-2 conduce a disfunción de los vasos (Bento *et al.*, 2010).

Por su parte la endostatina, un producto de escisión de los grupos carboxilo-terminal del colágeno, es un potente inhibidor de la proliferación y migración de células endoteliales y de la angiogénesis mediada por interacción con integrinas en estas células (Mucci *et al.*, 2009). Estos autores demostraron además que la administración sistémica de endostatina

aumenta la actividad apoptótica de células tumorales, disminuye la densidad microvascular y reduce tumores primarios.

Finalmente y pese a no tener un papel destacado en el aspecto angiogénico, la leptina tiene la capacidad de promover la migración de células endoteliales, ya que su interacción con el receptor presente en dichas células conduce a la activación de la vía Stat3 y potencia su unión al ADN (Sierra-Honigmann *et al.*, 1998). Además aumenta la expresión de VEGF a través de la activación de la vía Jak/Stat3 (Suganami *et al.*, 2004). De manera similar al VEGF-A, la leptina induce la formación de capilares fenestrados. Esto se confirmó por la ausencia de dichas fenestraciones en ratones Ob/Ob (Cao *et al.*, 2001). También tiene un efecto sinérgico sobre la estimulación de la angiogénesis por VEGF y FGF (Cao *et al.*, 2001).

## HIPÓTESIS

De la compleja red de interrelaciones entre angiogénesis y adipogénesis descripta, se deduce la interdependencia de ambos procesos. Para obtener evidencia experimental que la demuestre, se proponen los siguientes objetivos.

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto *in vivo* de la inhibición general de la angiogénesis sobre el tejido adiposo visceral y los procesos de proliferación y diferenciación de las CPA de su Fracción Estroma Vascular.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un modelo *in vivo* de inhibición farmacológica de la angiogénesis, verificando su efecto a los 15 días post-tratamiento.
2. Determinar la concentración de marcadores metabólicos y endocrinos circulantes que podrían afectar la función del tejido adiposo: glucosa, insulina, colesterol total, triglicéridos, NEFA, leptina y TBARS.
3. Evaluar los cambios morfológicos del TAV como resultado del tratamiento.
4. Evaluar el impacto del tratamiento sobre la capacidad proliferativa *in vitro* de las células de la FEV
5. Evaluar la expresión de marcadores de superficie de la población de células de la FEV en ambos grupos mediante citometría de flujo.
6. Evaluar las señales intracelulares con acción reguladora conocida sobre la angiogénesis y los procesos de proliferación y diferenciación adipocitaria, en tres estadios celulares: células de la FEV, células proliferadas *in vitro* sin diferenciar (día 0) y células proliferadas y diferenciadas *in vitro* (día 10).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Para la mayoría de las actividades del presente trabajo de tesis se utilizaron ratas macho adultas normales de la cepa Wistar, provistas por la Comisión Nacional de Energía Atómica (CO.N.E.A.), Centro Atómico Ezeiza U.A. Aplicaciones Tecnológicas. Desde la fecha de adquisición se dejó pasar como mínimo una semana antes de iniciar el tratamiento, a fin de adaptar a los animales a su nuevo ambiente.

Sólo para los experimentos de citometría de flujo se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley, criadas y mantenidas en el bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (I.M.BI.CE.).

En ambos bioterios, los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 22° C y 50% de humedad y bajo régimen de ciclos de luz/oscuridad de 12 hs de duración; con acceso a comida (alimento extrusado rata-ratón GANAVE, Santa Fé, Argentina) y agua corriente *ad-libitum*. Asimismo, en ambos bioterios se respetaron las normas del *National Institute of Health* (N.I.H.) para el cuidado y buen uso de animales de laboratorio.

### **Diseño experimental**

Al comenzar los tratamientos, los animales tenían 60 días de edad en ambas cepas; lo cual corresponde a alrededor de 200 g de peso corporal en los animales Wistar y de 340 g en los animales Sprague Dawley. Se dividieron luego aleatoriamente en dos grupos experimentales:

- φ **Grupo Control:** estos animales tuvieron acceso a alimento y agua corriente *Ad libitum* y recibieron, al inicio del tratamiento, una única inyección intraperitoneal de solución fisiológica (vehículo de la suramina) cuyo volumen fue de 1 uL/g de peso corporal.
- φ **Grupo Suramina:** Estos animales también tuvieron idéntico acceso al alimento y agua corriente que el grupo control, pero recibieron, al inicio del tratamiento, una

única inyección intraperitoneal de Suramina (sal hexasódica) a razón de 100 mg/kg peso corporal. El volumen de inyección fue idéntico al del grupo control.

El tratamiento en ambos casos tuvo una duración de 14 días. Durante dicho período se registró el consumo de agua y alimento, pesándose a los animales tres veces por semana.

### **Obtención de plasma y tejido adiposo visceral**

Finalizados los tratamientos, los animales se anestesiaron utilizando Isoflurano (FORANE<sup>®</sup>, Abbott Laboratories Argentina S.A., Florencio Varela, Buenos Aires) y se extrajo sangre mediante punción con tubo capilar heparinizado del plexo retroorbitario. La muestra obtenida se recogió en tubos con heparina y se centrifugó rápidamente a 4° C y a 2000 G durante 15 minutos, para separar la fracción de plasma que se conservó a -20°C hasta el momento de su procesamiento. Paralelamente se procedió al sacrificio del animal y la disección de su tejido adiposo visceral (TAV).

### **Determinación de glucemia**

La determinación de glucemia se realizó con sangre entera, utilizando tiras reactivas y el glucómetro Accu-check<sup>®</sup> Performa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) según sus instrucciones. Éste método se basa en una reacción enzimática utilizando glucosa deshidrogenasa recombinante.

### **Determinación de Triglicéridos**

La determinación de triglicéridos se realizó utilizando el kit de Wiener (Wiener laboratorios, Rosario, Argentina), siguiendo las indicaciones del correspondiente prospecto. Su funcionamiento se fundamenta en una serie de reacciones enzimáticas iniciadas por la enzima Lipoproteinlipasa.

### **Determinación de TBARS (*ThioBarbituric Acid Reactive Substances*)**

La determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se realizó según el procedimiento descrito por Yagi *et al.* En dicho protocolo se precipitan las proteínas y



lípidos, para descartar el sobrenadante (donde quedarán sustancias interferentes) y trabajar con una resuspensión del precipitado.

Al inicio de la técnica, se centrifugó brevemente los plasmas a 4° C (5 minutos a 600 G) para descartar cualquier agregado de fibrina. A continuación, se tomaron 150 µL de plasma, se les agregaron 350 µL de agua destilada, 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,08 N y 500 µL de ácido fosfotúngstico al 10%. La mezcla se mezcló utilizando un vortex y se dejó reposar 5 minutos. Luego se centrifugó a 2000 G por 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 4 mL de agua y se mezcló nuevamente (vortex) hasta lograr la resuspensión. Se adicionó 1 mL de solución de ácido tiobarbitúrico al 0,7 % p/v (en ácido acético al 50% v/v) y se incubó durante 60 minutos a 95°C. Después se enfriaron en baño de hielo y se agregó 3 mL de butanol, mezcla en vortex y centrifugación durante 10 minutos a 2000 G. El sobrenadante obtenido se transfirió a una placa Kartell® (Kartell, Noviglio, Italia) de 96 pocillos y se registró la emisión de fluorescencia en un lector multimodal de microplacas Synergy HT® (BioTek Instruments, Winooski, USA) utilizando un filtro de excitación de 530 ± 25 nm y un filtro de emisión de 590 ± 35 nm.

Se realizó un cociente entre las lecturas obtenidas y el contenido proteico de dichas muestras, a fin de expresar el resultado final como picomoles de malondialdehído por miligramo de proteínas plasmáticas

### **Determinación de proteínas**

El ensayo de proteínas plasmáticas se realizó utilizando el reactivo comercial de Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, USA), siguiendo las instrucciones de su manual. Éste método colorimétrico se fundamenta en el principio descrito por Bradford *et al* sobre el comportamiento del colorante Coomassie® Brilliant Blue G-250, que cambia su máximo de absorbancia de 465 nm a 595 nm en presencia de proteínas.

### **Determinación de insulina**

Se llevó a cabo mediante radioinmunoanálisis (RIA), utilizando un anticuerpo anti-insulina de rata y un estándar de insulina de rata (Linco Research, IN, USA) e insulina porcina altamente purificada marcada con yodo 125 (Herbert *et al* 1965, Linde *et al* 1980).

**Determinación de leptina en medio y leptinemia**

La determinación de leptina se realizó mediante una técnica de RIA específica desarrollada en el IMBICE. Para ello se utilizó un buffer EDTA 0,025 M, NaCl 0,9 % (p/v), Tritón (100x) 0,05 % (v/v) y Albúmina Sérica Bovina (BSA, por sus siglas en inglés) 0,5 % (p/v), utilizando buffer fosfato (PBS) 0,05 M, pH 7,4 como solvente. El anticuerpo fue obtenido en el citado laboratorio en conejo y contra ratón. Posee una reacción cruzada de 100% con leptina de rata y ratón, y menos de 1% con leptina humana (Giovambattista *et al*, 2000). La hormona marcada con I<sup>125</sup> utilizada como trazador, también se generó en el laboratorio, incorporando el isótopo en residuos tirosina de la hormona utilizando el método de Cloramina T. Esta reacción implica un primer paso de activación del NaI<sup>125</sup> (1 mCi, Amersham Biosciences, Piscataway, USA) con 10 µL de cloramina T (1 µg/µL) durante 15 segundos, luego se somete a 5 µL de Leptina (Peprotech, USA; 1 µg/µL) por 30 segundos. La reacción se detiene con el agregado de 10 µL de Metabisulfito de Sodio (8 µg/µL). La separación de la hormona iodada del yoduro radiactivo no incorporado se realiza en una columna de 75 cm de Sephacryl S-300, utilizando un buffer: 0,5% BSA; 0,025 M EDTA; 0,1% Azida sódica; 0,05 M PBS; 0,9 % NaCl.

Al comenzar cada protocolo de muestras, se realizó una primera mezcla de reacción con muestras o estándares (200 µL) y 50 µL de antisuero antileptina de ratón, que se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se agregaron 50 µL del trazador (aproximadamente 30.000 cpm) y las muestras se incubaron otras 24 hs a temperatura ambiente. La separación de la fracción de hormona libre se realizó por precipitación de los complejos hormona-anticuerpo con una solución de anticuerpo secundario (antisuero anti  $\gamma$  globulina de conejo obtenido en oveja) 1/50, Suero Normal de Caballo 1/10 en PBS y de Polietilenglicol 6000 (10% en PBS). Luego se realizó una incubación adicional de 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 30 minutos a 3.500 rpm a 4°C y se aspiraron los sobrenadantes.

La radiactividad  $\gamma$  emitida por los precipitados se registró en un contador Packard<sup>®</sup> Cobra II gamma counter, GMI, Minnesota, USA. Las cpm (cuentas por minuto) de las muestras se convirtieron en concentración utilizando una curva estándar. La técnica obtuvo un rango de detección entre 0,2 y 25 ng/mL.

### **Determinación de NEFA (*Non-Esterified Fatty Acids*; Ácidos grasos no esterificados)**

Para dicha determinación se utilizó el kit de RANDOX<sup>®</sup> (Randox Laboratories, USA), según las indicaciones detalladas en su prospecto.

### **Obtención de cortes histológicos**

Para realizar los estudios histológicos se obtuvo muestra de tejido adiposo visceral, próxima al hilio vascular y se la fijó inmediatamente en formaldehído al 4% en PBS durante 24 a 48 h. Posteriormente se la sometió al proceso de hidratación/deshidratación (agua 24 hs, etanol 70% durante 48 h, etanol 96% durante 4h y etanol 100% durante 4 h). Finalmente se aclaró en Xilol durante 24 a 48 h y se incluyó en parafina para formar el taco.

Dicho taco se cortó en secciones de 5  $\mu$ m de espesor utilizando un micrótomos Leica<sup>®</sup> RM 2125 (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland), las que fueron sometidas a coloración de Hematoxilina-Eosina tradicional (hematoxilina durante 1 minuto, agua durante 5 minutos y eosina durante 30 segundos).

### **Determinación del porcentaje de área vascular**

La determinación del porcentaje de área vascular se realizó observando 100 campos a gran aumento (400 X) en 2 niveles del taco por cada animal. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Nikon<sup>®</sup> Eclipse 80i (Nikon, Japón) adaptado a una computadora utilizando una interfase Nikon<sup>®</sup> Digital Sight DS-U1 y el programa OPTIMAS<sup>®</sup> (MediaCybernetics, USA).

**Determinación del diámetro adipocitario**

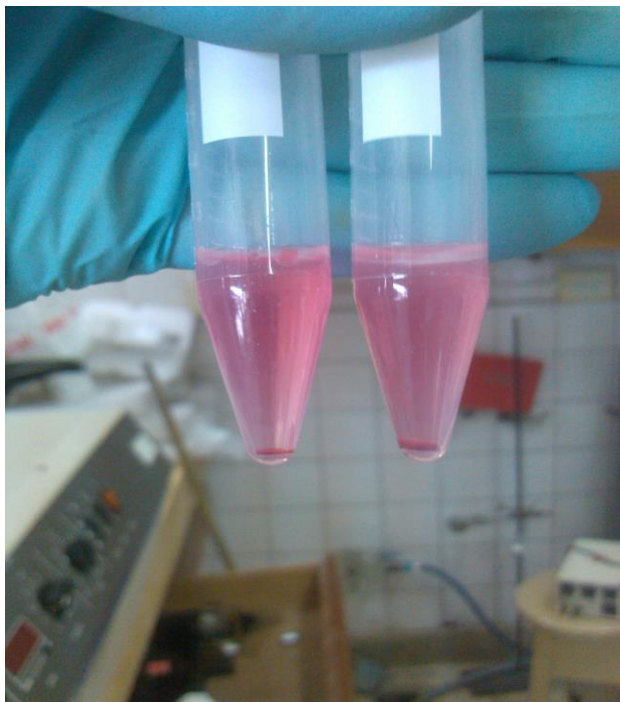
La determinación del diámetro adipocitario se realizó observando 300 células por campo a gran aumento (400 X) en 2 niveles del taco por cada animal. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Nikon<sup>®</sup> Eclipse 80i adaptado a una computadora utilizando una interfase Nikon<sup>®</sup> Digital Sight DS-U1 y el programa OPTIMAS<sup>®</sup>.

**Digestión del TAV y obtención de células de la FEV**

Para aquellos animales destinados a cultivo de células FEV, al finalizar el tratamiento se los sacrificó como se detalló en el apartado de “Obtención de plasma”, pero en este caso se mantuvo un ambiente aséptico alrededor del animal sacrificado. Esto se logró sacrificando al animal dentro de un perímetro de 15 cm de un mechero encendido, humedeciendo con alcohol 70% el área abdominal a incidir y utilizando material quirúrgico previamente esterilizado.

Obtenidas las muestras de tejido adiposo visceral se las colocó en tubos estériles con medio de cultivo (DMEM). Se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min y se eliminó el infranadante (ya que los panículos flotan). Todo el procedimiento se realizó dentro de una campana de flujo laminar, Luego se procedió a eliminar los pequeños restos de músculo adyacente y finalmente se procedió a la digestión de la muestra con colagenasa (Worthington, Lakewood, USA) colocando 4 mg de la enzima por cada gramo de tejido en un volumen de 4 mL de DMEM por gramo de tejido. Los volúmenes y proporciones utilizados fueron determinados mediante titulación y cuantificación de células FEV obtenidas por gramo de tejido y mayor porcentaje de viabilidad (evaluado mediante azul tripán).

La digestión se realizó a 37° C durante 50 minutos. Finalizada la misma, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos nuevamente. Ésta centrifugación (ver foto) evidencia tres niveles: adipocitos (superior), DMEM (centro) y células FEV (fondo).



**Figura 4:** Fotografía detallando las 3 fracciones obtenidas luego de la digestión del tejido.

Para obtener las células de interés se aspiraron las mismas (bajo campana), con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, filtrándolas a través de una malla estéril de porosidad adecuada para retener fragmentos tisulares no digeridos.

Se repitió una vez más la centrifugación y la filtración, para descartar el sobrenadante (por simple inversión del tubo) y las células se resuspendieron en 2 mL de DMEM. Se extrajo una alícuota para conteo en cámara de Neubauer con azul tripán 0,4% (SIGMA Chemical company, Saint Louis, USA) y evaluación de la viabilidad celular.

### **Citometría de flujo**

Las células de la FEV obtenidas de ambos grupos fueron resuspendidas en buffer FACS (aproximadamente  $2 \times 10^5$  células en 500  $\mu$ L de PBS conteniendo 0,5% p/v de BSA) y se las incubó inmediatamente con anticuerpos específicos fluorescentes o con sus respectivos isotipos (dilución 1/50 en buffer FACS), durante 1 hora a 4° C. Luego se lavaron y centrifugaron suavemente a 500 G durante 5 minutos a 4° C y el pellet celular obtenido se resuspendió en 500  $\mu$ L de buffer FACS para su análisis en el citómetro de flujo FACS Calibur® (Becton Dickinson Biosciences, USA). Al inicio el total de células obtenidas de la

FEV fueron identificadas según tamaño y complejidad de las distintas poblaciones que la componen, en función de los patrones de dispersión de luz, forward scatter (FSC) y side scatter (SSC), respectivamente. Luego se analizaron los marcadores de interés: CD34 (expresado en células madres hematopoyéticas y en las células progenitoras), CD31 (expresado en leucocitos y células endoteliales) y CD45 (expresado en células hematopoyéticas maduras) para realizar la identificación de las Células Progenitoras Adipocitarias (CPA), según inmunomarcación y la siguiente ecuación: CD34+/CD31-/CD45-. Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados: anti-CD34 de rata conjugado a PE (fluoróforo conjugado Ficoeritrina (PE), longitud de onda de emisión 578 nm, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), anti-CD45 de rata conjugado a FITC (fluoróforo conjugado Isotiocianato de Fluoresceína 1 (FITC), longitud de onda de emisión 514 nm, Santa Cruz Biotechnology Inc) y anti-CD31 de rata conjugado a FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc). Para cada muestra se registraron 50.000 eventos en la región de interés. El análisis de datos se realizó con los programas Cell Quest Pro<sup>®</sup> y FlowJo<sup>®</sup>. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones de Sistema Inmune de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Respecto a la citometría de flujo de las células de la FEV, cabe aclarar que al momento de realizar el primer experimento se utilizaron animales de la cepa Wistar, y se observaron problemas en la marcación de sus células. Se intentó un segundo experimento, cuidando minuciosamente todas las posibles interferencias; volviendo a obtener resultados negativos. Esto llevó a utilizar animales de la cepa Sprague-Dowley, que ya habían sido utilizados exitosamente en experimentos de éste tipo en los laboratorios del IMBICE. Es por ello que, como parte de los resultados, se encontrará descripto el perfil de expresión de genes de interés para ambas cepas de animales, a fin de fundamentar apropiadamente dicha utilización.

### **Cultivo de células de la FEV**

Un cultivo completo comprende dos etapas: una de **proliferación** y una de **diferenciación**.

La etapa de **proliferación** abarca desde la siembra de las células de la FEV (en una concentración de 30.000 células por mL) hasta el momento en que las células alcanzan una

confluencia de entre el 70% - 80% (esto suele suceder en el día 6, pudiendo ir del 5 al 7). Allí se inicia la etapa de **diferenciación**, para lo cual el medio se reemplaza por mezcla de diferenciación (que contiene agentes inductores tales como Isobutilmetilxantina, Dexametasona e Insulina) y a partir de ése momento se considera día 0 de diferenciación. Pasados dos días (día 2 de diferenciación) se comienza a utilizar medio de diferenciación, que es igual al medio de proliferación pero con el agregado de insulina. Dicha composición se mantendrá hasta el fin del cultivo, que se extenderá hasta el día 10 de diferenciación.

Las células de la FEV obtenidas según lo descripto previamente (ver apartado “obtención de células de la FEV”), se resuspendieron en un volumen de medio de proliferación suficiente para llegar a una concentración de 30.000 células vivas/mL. Este medio se compone de: SFB 10% V/V, Penicilina (G-sódica) 100 U/mL, Estreptomicina (sulfato) 0,1 mg/mL y DMEM como solvente.

Dicha suspensión se sembró en placas de 24 pocillos o en vidrios cubreobjetos estériles, dependiendo de la determinación a la cual fuera destinado cada cultivo en particular. Los mismos se mantuvieron en estufa a 37° C con 5% CO<sub>2</sub> y se les cambió el medio cada 2 días.

### **Proliferación de células de la FEV**

Para evaluar la proliferación de las células de la FEV, a partir del día 1 de cultivo se tripsinizó un mínimo de 4 pocillos/animal/día y una alícuota de la suspensión de células se contó en una cámara de Neubauer, expresándose los resultados en número de células por pocillo.

El procedimiento consistió en lavado (2 veces) de los pocillos de interés con buffer PBS pH 7,4, (200 µL/pocillo de tripsina 0,25% P/V en PBS), incubación durante 5 minutos a 37° C e inactivación de la tripsina (final de la digestión) mediante adición de 200 µL de suero y conteo final de células en cámara de Neubauer.

### **Diferenciación de las células en confluencia**

Aquellos cultivos destinados a otras determinaciones que no fueran proliferación, se sometieron al ya mencionado proceso de diferenciación inducida. Para ello, una vez

alcanzada la confluencia, se inició la **diferenciación** mediante el reemplazo del medio de proliferación por la mezcla de diferenciación, cuya composición es idéntica a la anterior pero con el agregado de insulina (5 µg/mL), dexametasona (2,5 µM) e IBMX (0,5 mM). La mezcla de diferenciación se mantuvo sólo por dos días, considerándose día 0 al del cambio de medio. Cumplidos los dos días, se volvió a cambiar el medio para reemplazarlo por otro que tiene igual composición al medio de proliferación pero con el agregado de Insulina (5 µg/mL). Dicha composición del medio se mantuvo hasta finalizar los cultivos.

### **Porcentaje de células diferenciadas y grados de diferenciación**

Para determinar el porcentaje de diferenciación al fin del período de cultivo, las células de la FEV fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles en placas de 6 pocillos, según el esquema propuesto (6 días de proliferación seguidos de 10 días de diferenciación). Al finalizar dicho esquema, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS (pH=7,4) y las células se fijaron con formaldehído 4% durante una hora.

Luego de realizar 3 lavados con PBS, se procedió a la tinción de Papanicolaou Biopur<sup>®</sup> (Biopur S.R.L. Rosario, Argentina) según se detalla en la Tabla 3.



<b>Paso</b>	<b>Tiempo</b>
Alcohol 96°	2 min 30 s
Alcohol 70°	2 min 30 s
Agua destilada	30 s
Hematoxilina	5 min
Agua corriente	1 min 15 s
Alcohol 70°	30 s
Orange G – 6	2 min 30 s
Alcohol 96°	15 s
Alcohol 96°	15 s
EA Biopur	5 min
Alcohol 96°	2 min
Alcohol 96°	2 min
Alcohol 100°	30 s
Alcohol 100°	30 s
Xilol	15 s
Xilol	15 s

**Tabla 3:** Protocolo de tinción de Papanicolaou Biopur.

Finalizado el mismo, se montó en portaobjetos con Bálsamo de Canadá y se secó en estufa a 60°C durante toda la noche.

Finalmente la cuantificación se realizó observando 5 campos a gran aumento (400 X) por cada vidrio/por animal. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Nikon<sup>®</sup> Eclipse 80i adaptado a una computadora utilizando una interfase Nikon<sup>®</sup> Digital Sight DS-U1 y el programa OPTIMAS<sup>®</sup>. El porcentaje se determinó tomando como 100% el número de núcleos observados y considerando células diferenciadas aquellas que mostraban vacuolas lipídicas.

También se procedió a determinar, para aquellas células diferenciadas, el grado de diferenciación mostrado. Ésto se realizó considerando la posición y laxitud del núcleo. Así, una célula en grado I muestra un núcleo de posición central y más laxo que el resto de los estadios, mientras que en el grado II el mismo se encuentra en algún punto entre el centro y la periferia celular. Finalmente, una célula en grado III presenta un núcleo perfectamente adyacente a la membrana y más pequeño.

### **Determinación de la composición de ácidos grasos mayoritarios y de triglicéridos**

En homogenados de tejido adiposo se extrajeron los lípidos totales mediante el método de Folch J y col (Folch *et al* 1957). El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAGs) obtenidos luego de transmetilación con trifluoruro de boro al 10 % en atmósfera de nitrógeno (75° C durante 45 min, seguidos de extracción), se realizó por medio de una columna capilar (Supelco, Avondale, PA, USA), montada en un equipo Hewlett Packard HP 6890 Series GC System Plus (Avondale, PA, USA) y un sistema integral computarizado.

Los EMAGs se identificaron comparando los tiempos relativos de retención con estándares altamente purificados (Sigma Co, USA y Avanti-Polar Lipis, Canada) y la distribución de la masa se calculó automáticamente cuantificando el área debajo de los picos.

### **Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

#### **Obtención de ARN total**

Tanto el tejido adiposo como las células aisladas de la FEV y las células obtenidas de los cultivos, se lisaron con reactivo Trizol<sup>®</sup> (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) y se mantuvieron a -80° C hasta la extracción posterior de su ARN total (en el caso de los tejidos, se requirió un paso previo de homogeneización para asegurar la lisis). La extracción se realizó siguiendo las indicaciones detalladas en el prospecto del Trizol<sup>®</sup>.

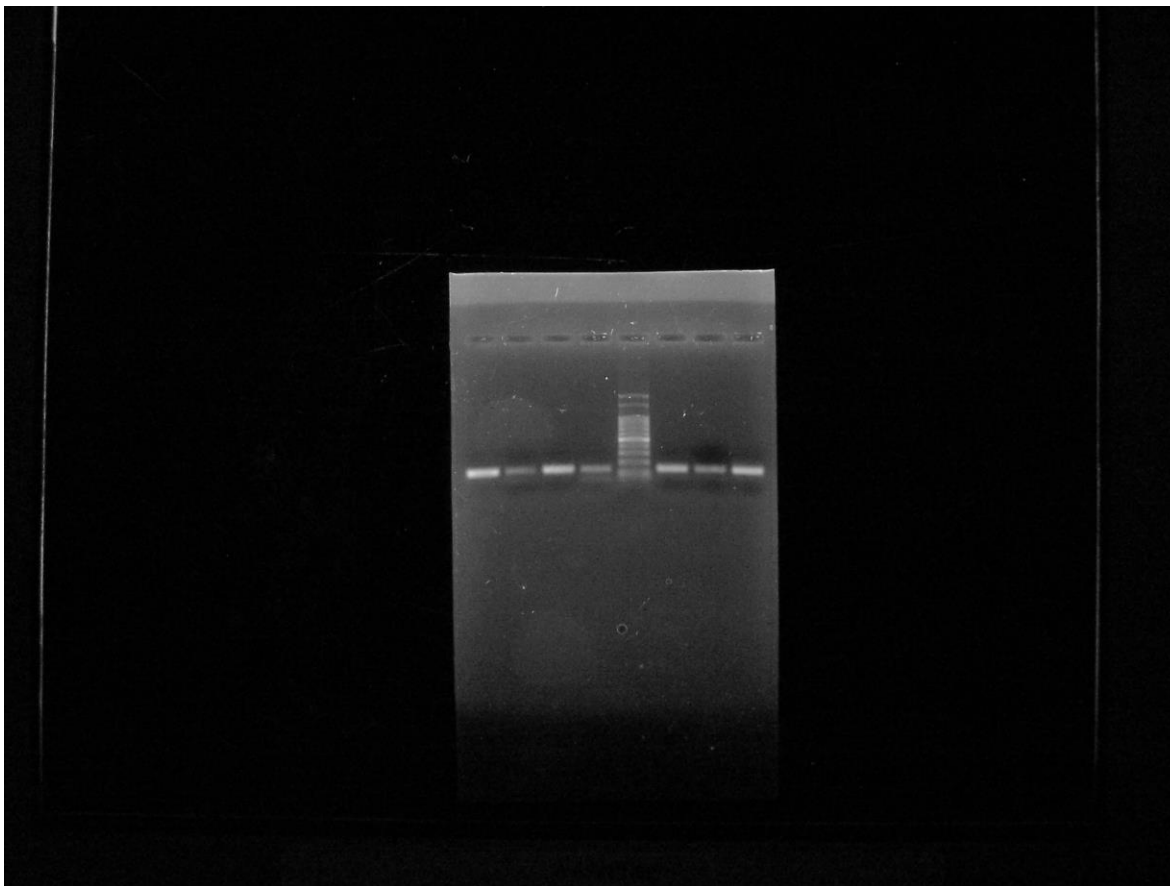
El ARN total obtenido se resuspendió en 50 µL de agua previamente tratada con Dietildipirocarbamato (DEPC). La integridad del ARN aislado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, verificando la presencia de las bandas liviana y pesada

ribosomales (18S y 28S). Se evaluó la contaminación por fenol y proteínas utilizando la relación entre las absorbancias leídas a 260 y 280 nm, en el lector multiplacas anteriormente mencionado; se consideraron óptimas aquellas muestras que exhibieran una relación entre 1,8 y 2. Complementariamente, la posible contaminación con ADN se evitó tratando las muestras con DNAasa I<sup>®</sup> (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) 1 U/ $\mu$ L previo al paso de transcripción reversa.

### **Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

La lectura a 260 nm del paso anterior permitió cuantificar el ARN total. En base a dicha cuantificación, para realizar la transcripción reversa (TR) se partió del volumen equivalente a 1  $\mu$ g de ARN total y se le agregó SuperScript III<sup>®</sup> (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) 200 U/ $\mu$ L (que contiene la enzima transcriptasa reversa del virus de leucemia murina), desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) 10 mmol/L, buffer 5X, ditioneitol (DTT) 0,1 mol/L, RNAasa out<sup>®</sup> (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, USA; enzima inhibidora de ribonucleasas) y oligodT (200-500 ng) como cebadores. Los cebadores poseen una cola poliadenilada que asegura que la transcripción se lleve a cabo exclusivamente sobre hebras de ARNm.

El protocolo de TR utilizado fue: 60 min a 50°C y luego 15 min a 70° C. La confirmación definitiva de que no hubiera contaminación con ADN genómico se realizó agregando una muestra con todos los componentes excepto transcriptasa reversa. La eficiencia de éste proceso se validó realizando una PCR de punto final en un termociclador Biometra<sup>®</sup> (Biometra Personal Cycler, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland), con un cebador para  $\beta$  actina (amplicón de 328 pb). La visualización del producto se realizó por medio de una corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5% usando Bromuro de Etidio como revelador (ver figura 5).



**Figura 5:** PCR de punto final con actina como cebador. De izquierda a derecha, las cuatro primeras calles corresponden a muestras, la quinta al estandar de peso molecular y las tres últimas a muestras.

### Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores utilizados en la presente tesis se basó en las secuencias complementarias al ADNc de rata (*Rattus Norvegicus*), que se obtuvieron del banco de genes del *National Institute of Health* (NIH); disponible en línea en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Para la tarea de diseño, se utilizó el software Primer3 (Rozen *et al* 2000). A fin de verificar la especificidad de los cebadores diseñados, se utilizó el software Blast (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La calidad teórica de los cebadores diseñados (posibilidad de formar horquillas, heterodímeros u homodímeros) se comprobó con el software IDTDNA (*Integrated DNA*

Technologies, SciTools, Oligo Analyzer;

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>)

Gen	Secuencia sentido Secuencia antisentido	Identificador <i>GenBank</i>
CEBP/ $\alpha$	5'-CTGCGAGCACGAGACGTCTATAG-3' 5'-TCCCGGGTAGTCAAAGTCACC-3'	NM_012524
LEP	5'-GAGACCTCCTCCATCTGCTG-3' 5'-CTCAGCATTCAGGGCTAAGG-3'	NM_013076
PPAR- $\gamma$ 2	5'-AGGGGCCTGGACCTCTGCTG-3' 5'-TCCGAAGTTGGTGGGCCAGA-3'	NW_047696
Pref-1	5'-TGCTCCTGCTGGCTTTCGGC-3' 5'-CCAGCCAGGCTCACACCTGC-3'	NM_053744
Zfp423	5'-CCGCGATCGGTGAAAGTTG-3' 5'-CACGGCTGGATTTCGGATCA-3'	NM_053583.2
LpL	5'-AGCGCTCCATCCATCTCTTCATTG-3' 5'-GCCCCAGTTGTTACAGCGATTCTT-3'	NM_012598.2
$\beta$ -actina	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3' 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'	NM_031144.3
Adiponectina	5'-AATCCTGCCCAGTCATGAAG-3' 5'-TCTCCAGGAGTGCCATCTCT-3'	NM_144744
Caspasa 3	5'-CAAGTCGATGGACTCTGGAA-3' 5'-GTACCATTGCGAGCTGACAT-3'	NM_012922.2
Caspasa 8	5'-TAAAAAGCAGCCCAGAGGAA-3' 5'-ATCAAGCAGGCTCGAGTTGT-3'	NM_022277.1
Caspasa 9	5'-CCAGATGCTGTCCCATAACC-3' 5'-ATTGGCGACCCTGAGAAG-3'	NM_031632.1
Bcl-2	5'-CGGGAGAACAGGGTATGA-3' 5'-CAGGCTGGAAGGAGAAGAT-3'	L14680.1
Caspasa 9	5'-CCAGATGCTGTCCCATAACC-3' 5'-ATTGGCGACCCTGAGAAG-3'	NM_031632.1

Gen	Secuencia sentido Secuencia antisentido	Identificador <i>GenBank</i>
Angiopoyetina 1	5'-ACTGGGAAGGGAACCGAGCCT-3' 5'-TGCTGTCCCCGTGTGACCCT-3'	NM_053546.1
Angiopoyetina 2	5'-CCTGTCCGGCGAGGAGTCCA-3' 5'-GCGTCGAACCACCAGCCTCC-3'	NM_134454.1
VEGF-A	5'-GCCAGGCTGCAGGAAGGAGC-3' 5'-TCTGCCGGAGTCTCGCCCTC-3'	NM_031836.3
Endostastina	5'-GTTTGGTCTTGCTGCTGGTG-3' 5'-ATCTTCTGGGGTAGGGGGTC-3'	NM_053489.2

**Tabla 4:** Detalle de los cebadores utilizados.

Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen Argentina y fueron probados realizando una PCR punto final utilizando una mezcla (*pool*) de ADNc de adipocitos (o células FEV) de ratas, como molde de la enzima Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen), en presencia de dNTPs (10 mmol/L) y catión magnesio (1,5 mmol/L). El perfil de termociclos utilizados fue el siguiente: un ciclo de 15 min a 95° C, seguido por 40 ciclos de tres pasos cada uno (15 seg. a 94° C, 30 seg. a 50-60° C dependiendo del par de cebadores utilizado y 30 seg. a 72° C) y un paso final de 10 min a 72° C. Los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de Bromuro de Etidio y fotografiados con un equipo digital Kodak con filtro UV.

### **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)**

Se realizó utilizando un volumen final de 25 µL conteniendo: el ADNc obtenido de la retrotranscripción de 1 µg de ARN, 10X PCR buffer (Tris HCl 200 mmol/L pH 8,4 y KCl 500 mmol/L), 10 µM de cada cebador, 2,5 U de enzima (Platinum Taq Polimerasa), dNTPs 10 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L, Sybergreen<sup>®</sup>. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Bio-Rad<sup>®</sup> modelo MJ mini (Bio-Rad lab, USA). El perfil de termociclos fue el ya descrito, con el agregado del registro de la fluorescencia al terminar cada ciclo y el registro de la fluorescencia en función de un gradiente térmico al finalizar todos los ciclos (curva de *melting*).

Dicha curva de fusión (*melting*) permite descartar la generación de más de un producto por cada cebador y se fundamenta en la labilidad térmica de dichos productos. Se comienza desde 55° C y se llega hasta 90° C, subiendo a intervalos de 0,5° C. En cada intervalo se registra la fluorescencia. Sabiendo que cada producto (en base a su composición específica de nucleótidos) tendrá una temperatura única y definida de fusión, el observar un único pico en el gráfico de fluorescencia en función de las temperaturas asegura la inexistencia de productos secundarios (no deseados). Al mismo tiempo, si la temperatura del pico coincide con la esperada para el producto, se afianza la idea de que el producto es el buscado.

Se evaluó también la eficiencia individual para cada par de cebadores calculada con una curva estándar y su ciclo umbral (Ct, de *cycle threshold*). Dicha curva consiste en diluciones seriadas de una mezcla de muestras de ADNc obtenidas de tejido (o células, en cada caso) de varios animales de cada grupo.

El método de cuantificación elegido fue el descrito por Pfaffl (2001), evaluando los niveles de cada producto por comparación con el estándar interno (en nuestro caso,  $\beta$  actina) de la misma muestra y luego entre las muestras de ambos grupos.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el test de t de Student para muestras independientes. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad (p) era menor a 0,05.

## **RESULTADOS**

### **Parámetros corporales y alimentarios.**

Los animales de ambos grupos no mostraron diferencias significativas en cuanto a peso corporal, consumo de agua y alimento al final del tratamiento (Tabla 5). Ambos grupos de animales presentaron una curva de crecimiento similar ya que partiendo del mismo peso inicial (entre 210 y 230 g) llegaron al mismo peso final. Por otra parte, se observó que la cantidad de calorías requeridas por cada gramo de aumento de peso tuvo un rendimiento similar (no significativo):  $15,51 \pm 0,15$  Kcal/g para control y  $16,09 \pm 0,21$  Kcal/g para el grupo Suramina.

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Agua (mL/día)</b>	<b>Alimento (g/día)</b>
Control	$277,2 \pm 4,4$	$26,2 \pm 1,1$	$20,2 \pm 0,5$
Suramina	$277,4 \pm 5,1$	$25,9 \pm 1,2$	$19,3 \pm 0,7$

**Tabla 5:** Comparación entre los parámetros mencionados para ambos grupos. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM; n = 20 animales por grupo. No se observan diferencias significativas en ninguno de los casos.

El alimento comercial utilizado durante el tratamiento de los animales contiene 62,8% de nutrientes y un 37,2% de sustancias no nutritivas. De los primeros, un 45% corresponde a hidratos de carbono, un 43% a proteínas y un 12% a lípidos. De éste modo, cada gramo de alimento consumido implica un aporte total de 2,9 Kcal; por lo que el grupo control consumió  $58,4 \pm 1,44$  Kcal/día y el grupo tratado  $55,8 \pm 2,02$  Kcal/día. Esta última diferencia no es significativa.

### **Indicadores metabólicos generales**

A fin de evaluar el estado general de los animales, se midieron los siguientes parámetros endócrino-metabólicos: glucemia, trigliceridemia, NEFA, TBARS, insulinemia y leptinemia. Ninguno de ellos presentó diferencias significativas entre ambos grupos (tabla 6).



Parámetro	Grupo Control	Grupo Suramina
Glucemia (mg/dL)	108,60 ± 3,4	105,60 ± 3,8
Trigliceridemia (mg/dL)	100,6 ± 7,6	101,1 ± 7,6
TBARS (pmol MDAD/mg proteína)	704,7 ± 115,0	498,8 ± 91,9
Insulinemia (ng/mL)	0,34 ± 0,04	0,37 ± 0,05
Leptinemia (ng/mL)	2,40 ± 0,37	3,04 ± 0,51
NEFA (mmol/mL)	0,222 ± 0,025	0,246 ± 0,066

**Tabla 6:** Comparación entre los parámetros mencionados para ambos grupos. Los datos son expresados como la media ± EEM, donde n = 10 por grupo. No se observan diferencias significativas en ninguno de los casos.

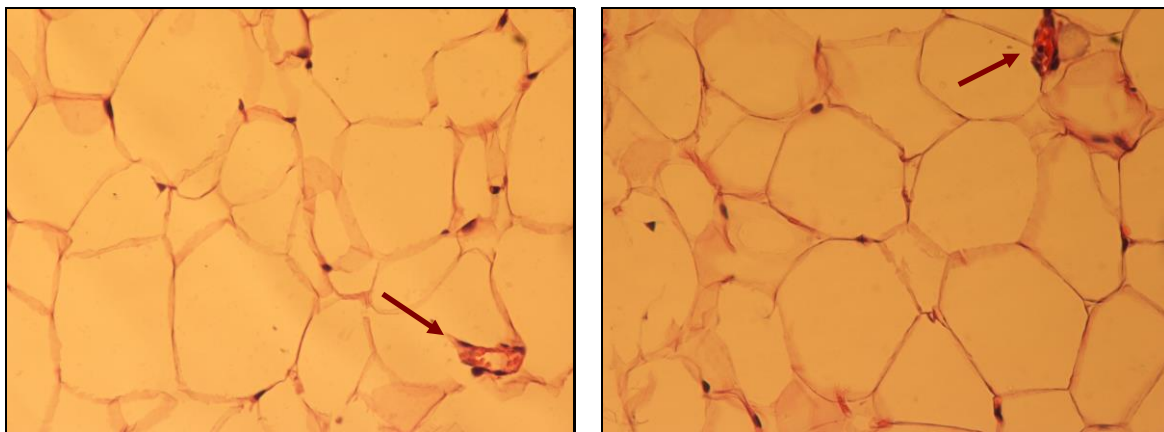
### Tejido adiposo visceral

#### Parámetros generales

En ambos grupos el tejido adiposo visceral representó un 0,76 % del peso corporal de cada animal. No se observaron diferencias significativas en la cantidad absoluta de tejido adiposo (2,13 ± 0,18 g grupo control vs. 2,24 ± 0,19 g grupo Suramina; n = 20).

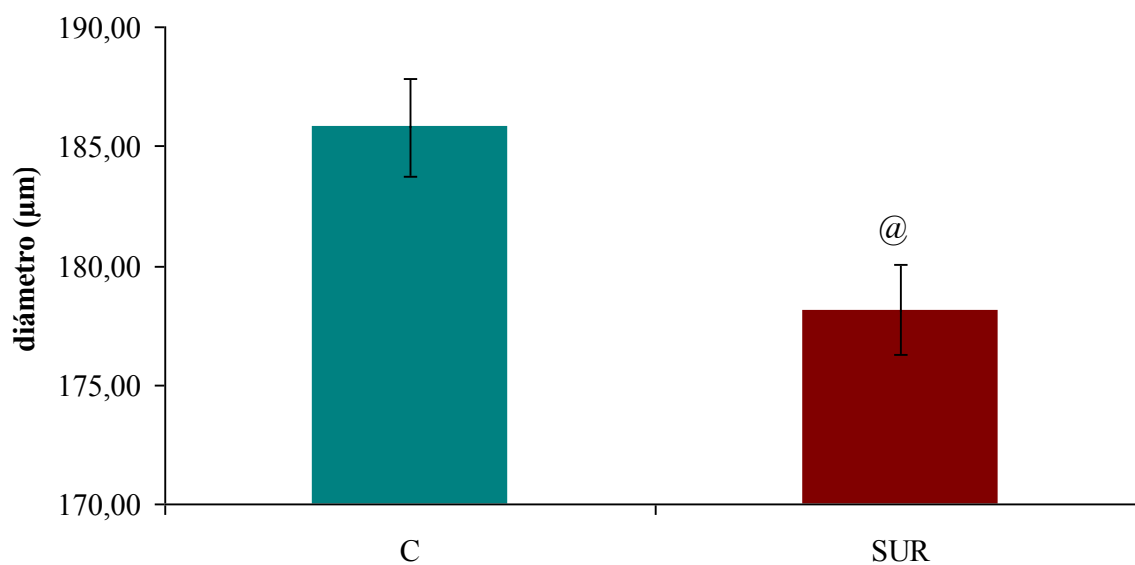
#### Histología del tejido adiposo

El estudio histológico mostró una disminución significativa del porcentaje de área vascular en el grupo tratado respecto al grupo control (0,14 ± 0,02 % vs. 0,26 ± 0,03 %, p < 0,05; n = 5 animales, 2 niveles de corte) (figura 6).



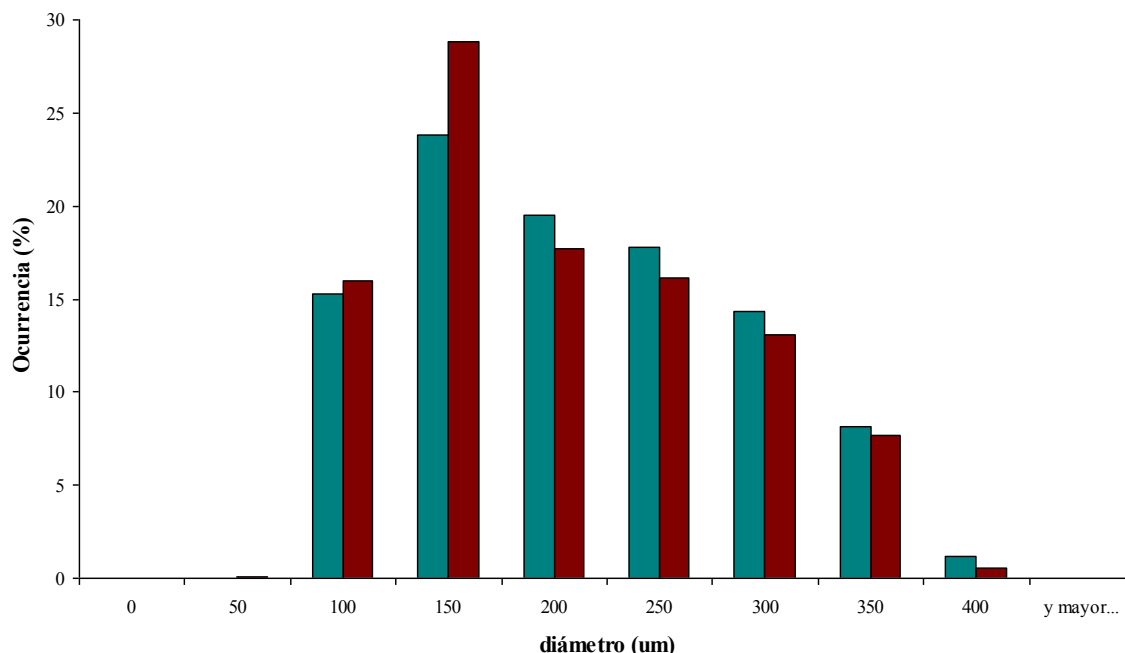
**Figura 6:** Cortes de tejido adiposo visceral de animales Control (izquierda) y Suramina (derecha). Tinción de hematoxilina-eosina, aumento 400 X.

Cuando se midió el diámetro de los adipocitos de ambos grupos, se observó una disminución estadísticamente significativa en el grupo tratado con suramina (Figura 7).



**Figura 7:** Diámetro adipocitario (expresado en  $\mu\text{m}$ ). Se midieron 300 adipocitos por muestra, y se trabajó sobre muestras de 5 animales por grupo, 2 niveles por bloque, @  $p < 0,01$ .

La distribución de los diámetros adipocitarios en cada grupo se muestra como histograma en la figura 8.



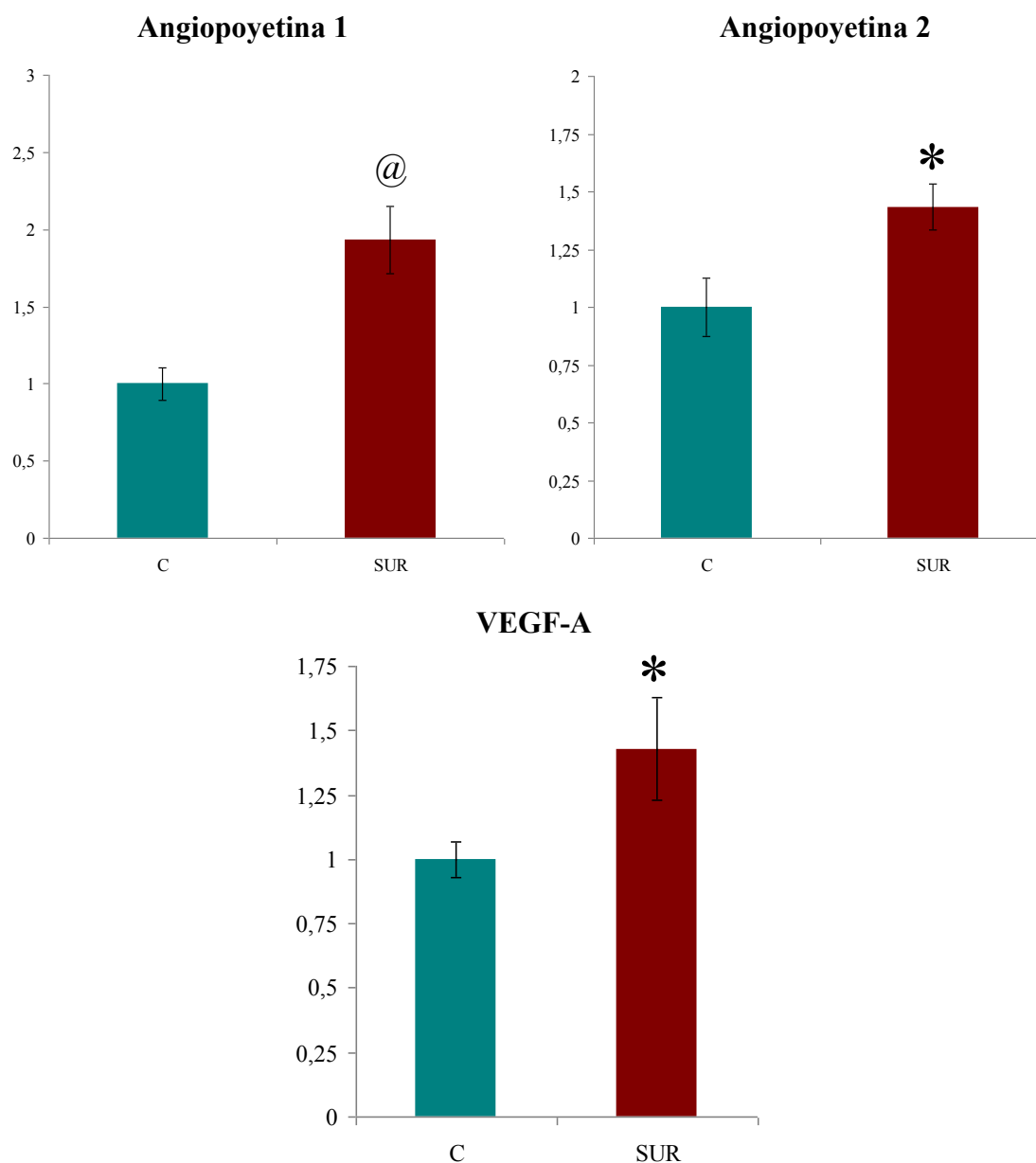
**Figura 8:** Histograma de distribución de diámetros adipocitarios. Se midieron 300 adipocitos por muestra, y se trabajó sobre muestras de 5 animales por grupo, 2 niveles por bloque. En cada categoría, la barra izquierda representa a los diámetros de los adipocitos provenientes de animales control y la barra derecha el de los tratados con suramina. Obsérvese que en las categorías desde 0 a 150, la ocurrencia observada es mayor para el grupo suramina, mientras que en las categorías que van desde 200 hasta el final, la ocurrencia es mayor para el grupo control.

La diferencia de frecuencias entre las categorías se cuantificó utilizando la prueba de Chi cuadrado, estableciendo para ello un punto de corte por encima y por debajo de un diámetro de 200  $\mu\text{m}$  (diámetro medio entre valores mínimos y máximos registrados). En función de esta clasificación, en el grupo control un 39,1% de los adipocitos muestra un diámetro menor a 200  $\mu\text{m}$ , mientras que en el grupo Suramina lo hace el 44,8% ( $p < 0,01$ ).

### **Análisis de la expresión génica del tejido adiposo visceral (cepa Wistar)**

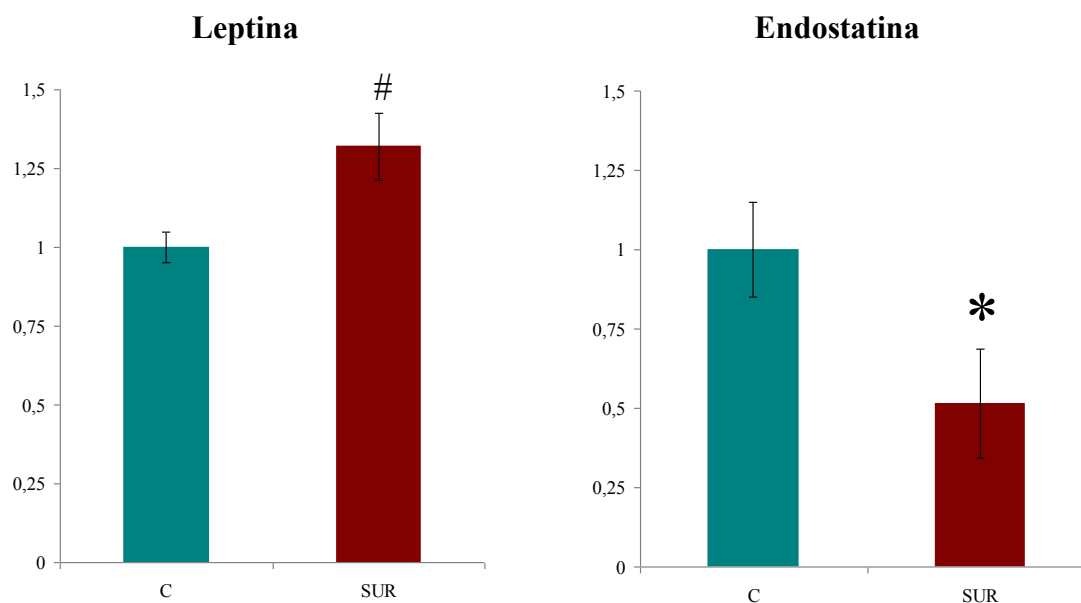
Se estudió la expresión génica en ARN obtenido de homogenados de tejido adiposo visceral. Los genes estudiados se relacionan con el proceso angiogénico (angiopoyetinas 1 y 2 y VEGF-A), marcadores metabólicos adipocitarios (leptina y endostatina) y marcadores apoptóticos y anti-apoptóticos (caspasas 3, 8, 9 y Bcl-2).

La expresión de angiopoyetinas 1, 2 y la de VEGF-A aumentaron en el grupo tratado respecto al grupo control (figura 9).



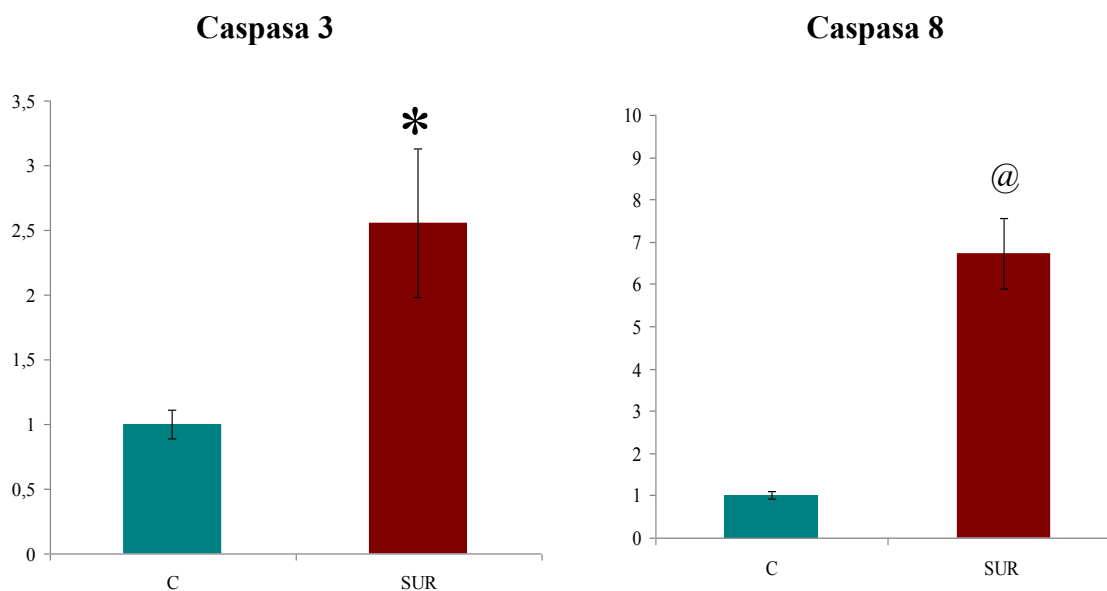
**Figura 9:** Expresión relativa de angiopoyetina 1, 2 y VEGF-A en tejido adiposo visceral de ambos grupos. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 3 muestras por grupo. La significación es @  $p < 0,01$  para angiopoyetina 1, \*  $p < 0,05$  para angiopoyetina 2 y VEGF-A.

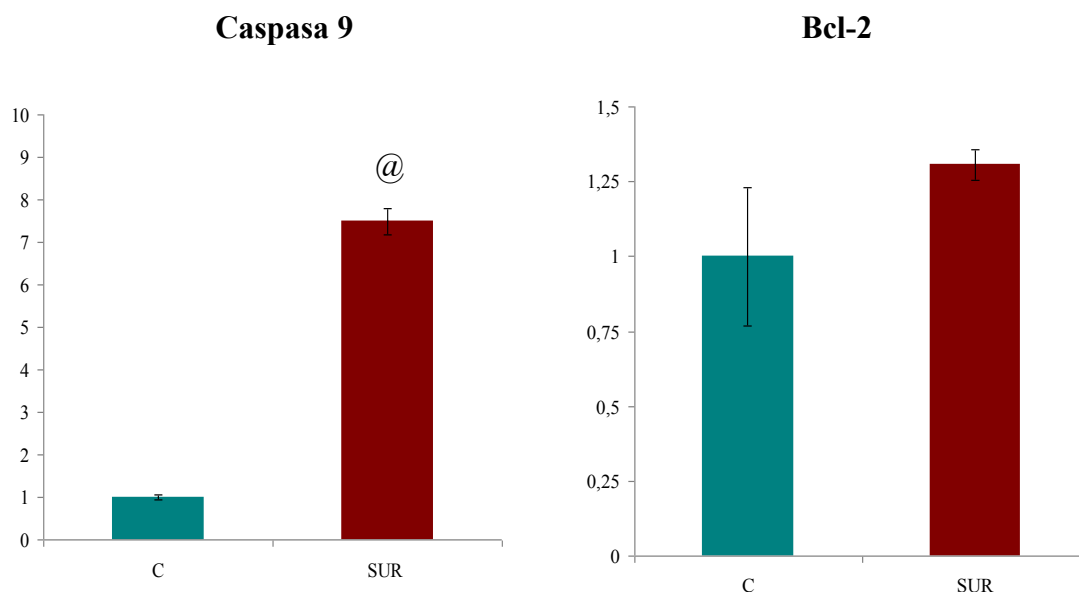
La expresión de leptina y endostatina mostró un aumento de la expresión de la primera asociada a una disminución de la segunda (figura 10).



**Figura 10:** Leptina y endostatina en tejido adiposo visceral en ambos grupos. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 3 muestras por grupo. Para la leptina la significación es de  $\# p < 0,02$ , mientras que en el caso de endostatina es  $* p < 0,05$ .

Respecto a los genes relacionados con la apoptosis, se registró un aumento significativo de las caspasas 3, 8 y 9 en el grupo tratado respecto al control, sin registrarse cambios significativos en la expresión de Bcl-2 (figura 11).



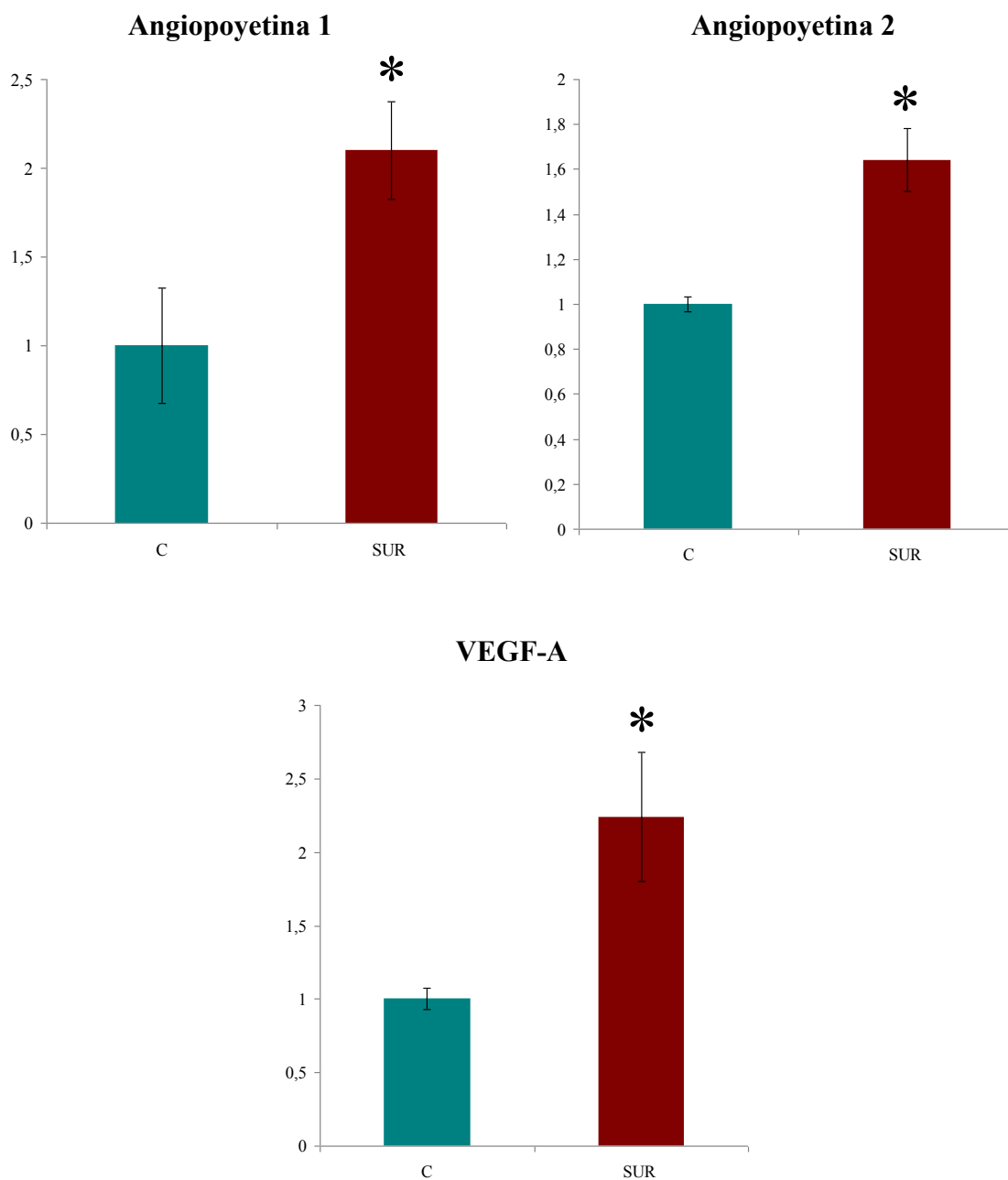


**Figura 11:** Expresiones relativas de Caspasa 3, 8, 9 y Bcl-2. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 3 muestras por grupo. En el caso de caspasa 3, la significación es \*  $p < 0,05$ ; mientras que para caspasas 8 y 9 es @  $p < 0,01$ .

#### **Análisis de la expresión génica del tejido adiposo visceral (cepa Sprague-Dowley)**

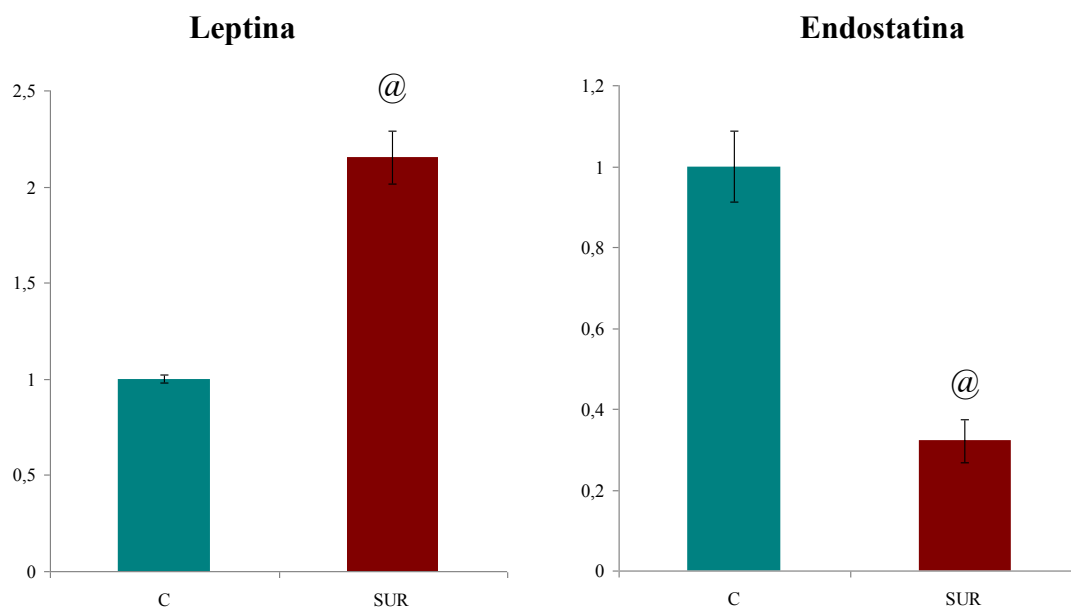
Dado que por razones técnicas los estudios de citometría de flujo se hicieron en ratas de la cepa Sprague-Dowley, repetimos los estudios realizados en las ratas Wistar para verificar la similitud de efectos del tratamiento sobre el tejido adiposo visceral en ambas cepas.

En la expresión de angiopoyetinas 1, 2 y VEGF-A, se replicó exactamente lo encontrado en la cepa Wistar, es decir, un aumento significativo de la expresión de los tres en el grupo tratado respecto al grupo control (figura 12).



**Figura 12:** Expresión relativa de angiopoietina 1, 2 y VEGF-A en tejido adiposo visceral en ambos grupos. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 3 muestras por grupo. La significación es \*  $p < 0,05$  para los tres por igual.

La expresión de leptina y endostatina también reprodujeron el comportamiento encontrado en la cepa Wistar, es decir, un aumento de la expresión de leptina y una disminución de la de endostatina (figura 13).

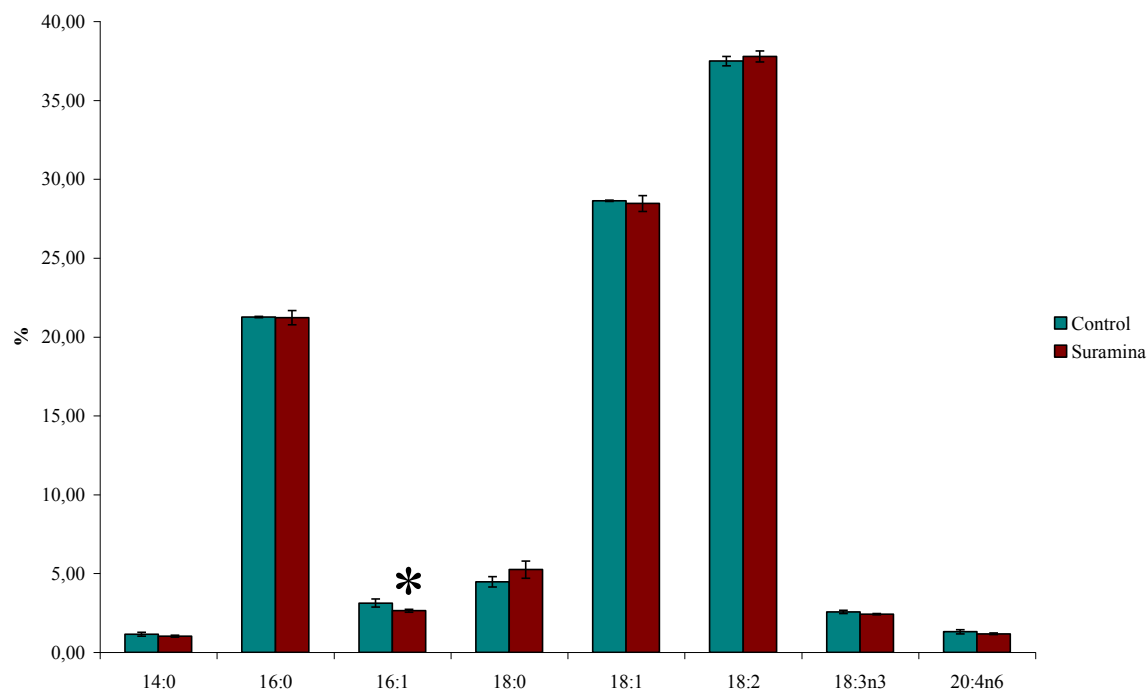


**Figura 13:** Expresión relativa de leptina y endostatina en tejido adiposo visceral en ambos grupos. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 3 muestras por grupo. En ambos casos, la significación es @  $p < 0,01$ .

### Composición de ácidos grasos del Tejido adiposo visceral

El análisis de la composición de ácidos grasos del tejido adiposo visceral reveló sólo un descenso del ácido palmitoleico (16:1) en el grupo tratado respecto al grupo control ( $p < 0,05$  con  $n = 5$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los otros.





**Figura 14:** Composición relativa en ácidos grasos del tejido adiposo visceral en ambos grupos. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 5 muestras por grupo. Sólo se encuentran diferencias en el ácido palmitoleico, donde  $* p < 0,05$ .

El detalle de los valores y los índices más comunes calculables se detallan en la tabla a continuación.

Ácido graso	Control	Suramina
14:0	1,16 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,06
16:0	21,32 $\pm$ 0,07	21,22 $\pm$ 0,46
16:1	3,12 $\pm$ 0,17	2,65 $\pm$ 0,09*
18:0	4,48 $\pm$ 0,22	5,25 $\pm$ 0,54
18:1	28,62 $\pm$ 0,03	28,46 $\pm$ 0,50
18:2	37,40 $\pm$ 0,22	37,79 $\pm$ 0,35
18:3n3	2,57 $\pm$ 0,07	2,43 $\pm$ 0,04
20:4n6	1,35 $\pm$ 0,10	1,18 $\pm$ 0,05

Ácido graso	Control	Suramina
$\Sigma$ saturados	26,96 $\pm$ 0,19	27,01 $\pm$ 0,78
$\Sigma$ monoinsaturados	31,74 $\pm$ 0,20	31,60 $\pm$ 0,15
$\Sigma$ saturados/ $\Sigma$ monoinsaturados	0,85 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,03
18:2/20:4	28,13 $\pm$ 2,49	33,37 $\pm$ 1,78
$\Sigma$ PUFA	41,31 $\pm$ 0,07	41,39 $\pm$ 0,68
$\Sigma$ saturados/ $\Sigma$ PUFA	0,65 $\pm$ 0,00	0,65 $\pm$ 0,03

**Tabla 7:** Composición relativa porcentual en ácidos grasos del tejido adiposo visceral en ambos grupos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM, con 5 muestras por grupo. También se detallan los índices más utilizados. Sólo se encuentran diferencias en el ácido palmitoleico, donde \*  $p < 0,05$ .

### Células de la Fracción Estroma Vascular

#### Parámetros generales

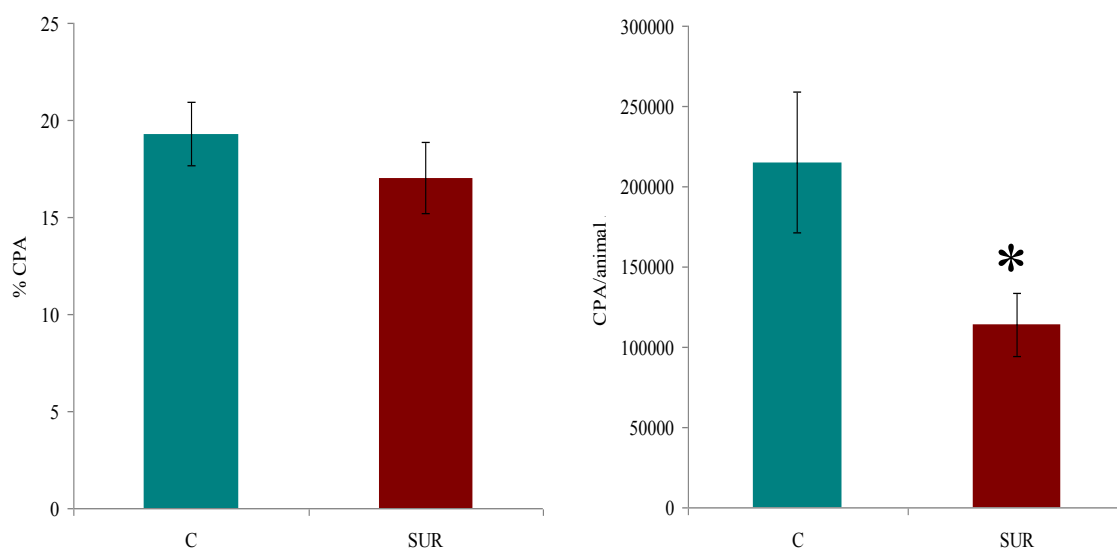
La cantidad de células de la fracción estroma vascular obtenidas luego de la digestión del tejido adiposo de cada animal de la cepa Wistar fue levemente inferior aunque no significativa, para el grupo tratado respecto al control (565.300  $\pm$  40.000 células vs. 635.000  $\pm$  55.000 células), ( $n = 20$ ). Asimismo, la cantidad de células obtenidas por gramo de tejido fue de 252.000  $\pm$  46.000 células/g para Suramina y 298.000  $\pm$  49.000 células/g para el grupo Control (diferencia no significativa).

La misma tendencia se observó en la cepa Sprague-Dowley, donde el rendimiento de los animales control fue de 1.166.000  $\pm$  273.500 células mientras que en los tratados registramos un promedio de 670.000  $\pm$  88.800 células ( $n = 5$ , diferencias no significativas).

#### Citometría de flujo de células de la fracción estroma vascular

La citometría de flujo de las células de la fracción estroma vascular reveló que el grupo control presentaba un 19,3  $\pm$  1,6 % de células progenitoras adipocitarias (CPA), mientras que el grupo tratado presentaba 17,0  $\pm$  1,8 % ( $n = 5$ , diferencia no significativa). Esta diferencia se hizo significativa cuando los datos se expresaron en número de células progenitoras adipocitarias por animal (figura 15). Esto evidencia una disminución en el

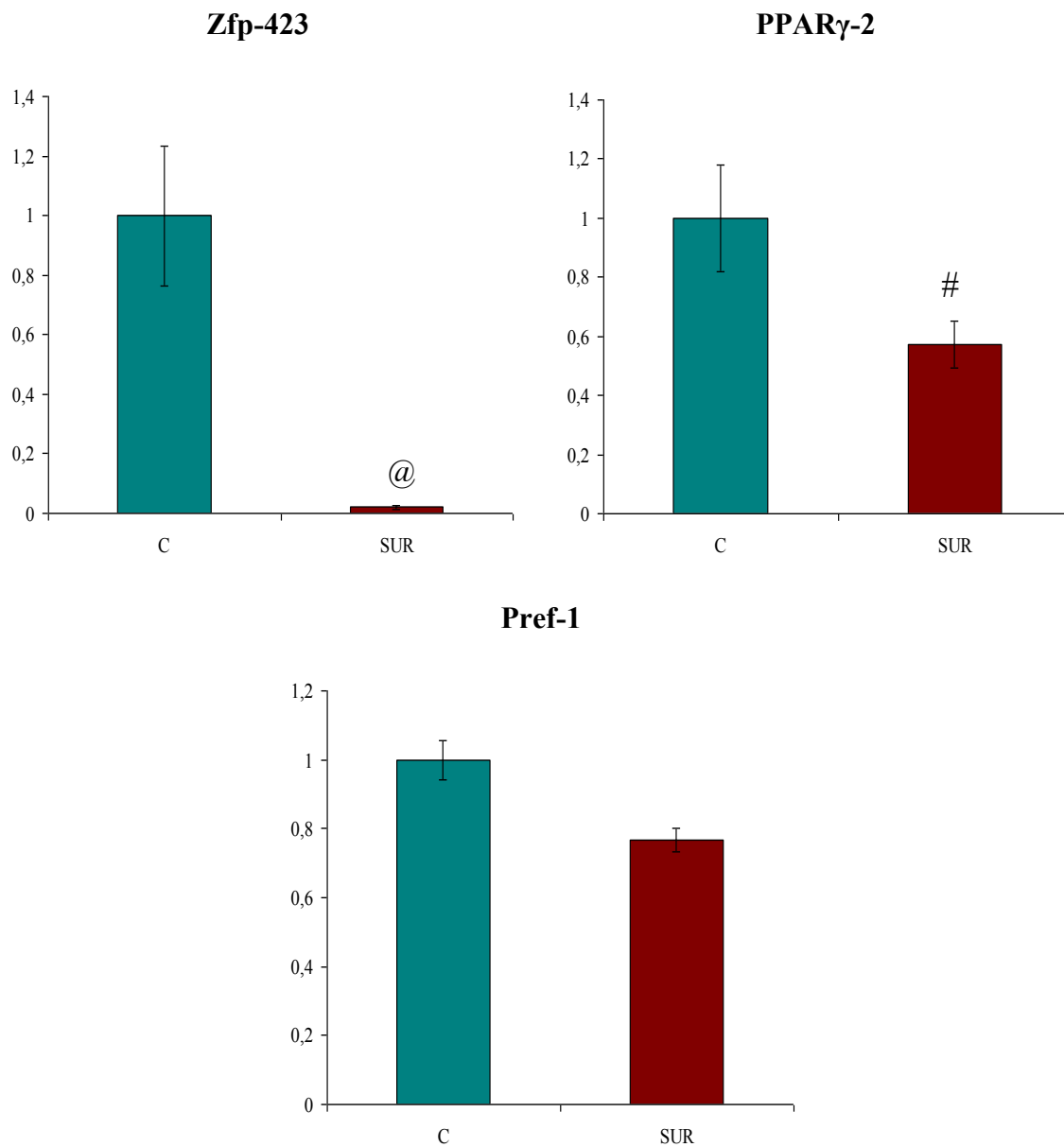
número total de células de la fracción estroma vascular en el grupo tratado sin que se modifique el porcentaje de células progenitoras adipocitarias.



**Figura 15:** Porcentaje de células progenitoras adipocitarias y cantidad de las mismas por animal. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 5 muestras por grupo. La significación es  $p * < 0,05$  sólo para el último caso.

### **Análisis de la expresión génica de células de la fracción estroma vascular**

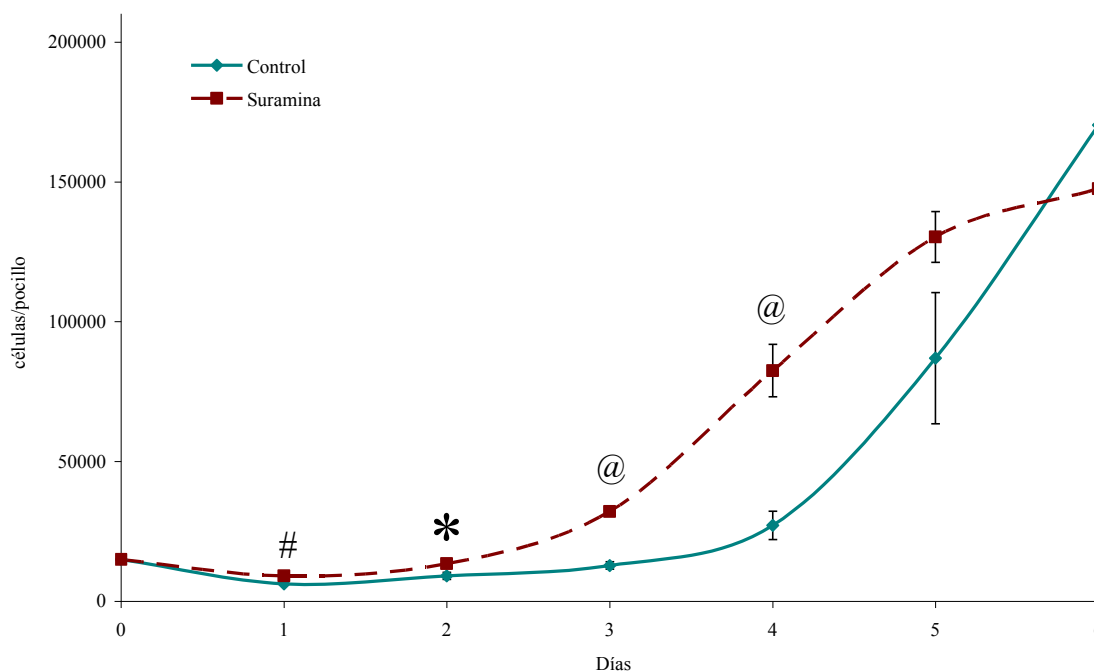
En homogenados de células de la fracción estroma vascular, se verificó la expresión génica (ARNm) de genes que representan señales estimuladoras (Zfp-423 y PPAR $\gamma$ -2) e inhibidoras (Pref-1) del proceso de diferenciación adipocitaria. En todos los casos registramos una disminución de la expresión en los animales tratados con suramina que solo fue significativa en el caso del Zfp-423 y PPAR $\gamma$ -2 ( $p < 0,01$  y  $0,02$ , respectivamente; figura 16).



**Figura 16:** Expresión de ARNm de las células de la fracción estroma vascular. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM, con 3 muestras por grupo. La significación es @  $p < 0,01$  para el primer caso y #  $p < 0,02$  para el segundo.

### Estudio de proliferación celular

La curva de proliferación de células de la fracción estroma vascular en cultivo se muestra en la figura 17.

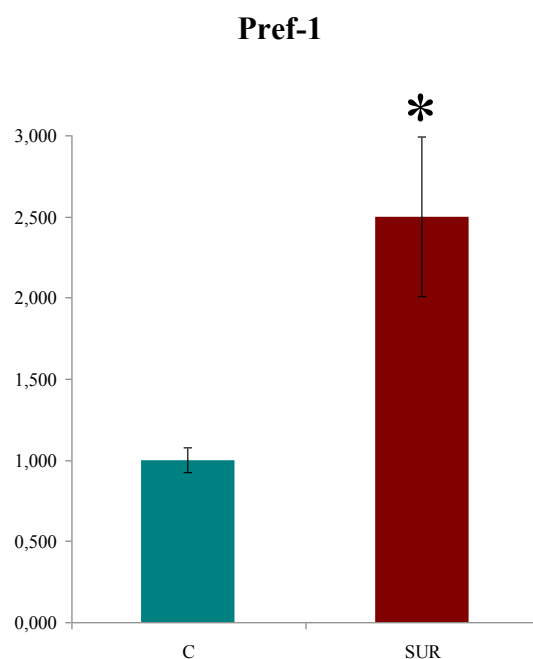


**Figura 17:** Cinética de proliferación de las células de la fracción estroma vascular en cultivo. Los valores representan la media  $\pm$  EEM, con un mínimo de 4 pocillos/día. Los puntos marcados poseen diferencias significativas, según la siguiente descripción: #  $p < 0,02$ , \*  $p < 0,05$ , @  $p < 0,01$ .

En ella puede apreciarse un desplazamiento hacia la izquierda en las células provenientes de los animales tratados, con diferencias significativas en la cantidad de células por pocillo entre los días 1 al 4 entre ambos grupos. En cambio la pendiente de las curvas en el período que va del día 4 al 6 en el grupo control y del 3 al 5 en el grupo Suramina no difieren significativamente ( $71.607 \pm 19.225$  control vs.  $49.132 \pm 5.179$  suramina). Esto sugiere que aunque la dinámica proliferativa es distinta para ambos grupos, a partir del día 6, que es el comienzo de la diferenciación, ambos grupos muestran igual número de células (diferencia no significativa:  $170.400 \pm 33.400$  control vs.  $147.500 \pm 10.800$  suramina).

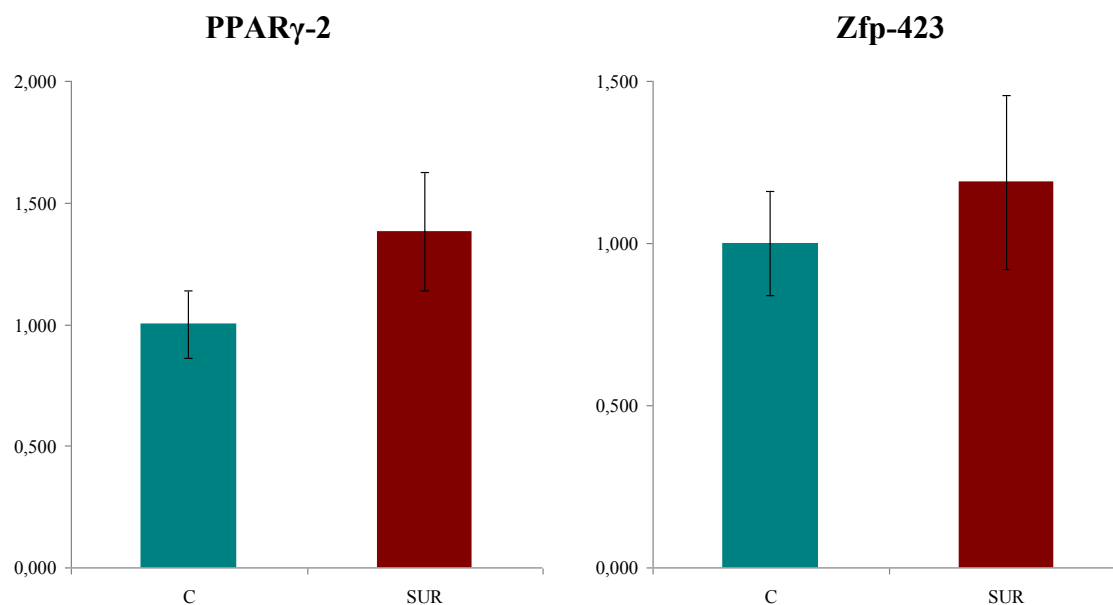
### **Análisis de la expresión génica de células al final del período de proliferación (día 6 de proliferación)**

Completada la etapa de proliferación, se analizó el mismo patrón de expresión génica que en las células FEV. Nuevamente, los genes estudiados son Zfp-423 y PPAR $\gamma$ -2 como señales estimuladoras del proceso de diferenciación y Pref-1 como señal inhibidora. Registramos un aumento significativo de la expresión de pref-1 en el grupo tratado respecto al grupo control (figura 18).



**Figura 18:** Expresión relativa de Pref-1. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 5 muestras por grupo. La significación es \*  $p < 0,05$ .

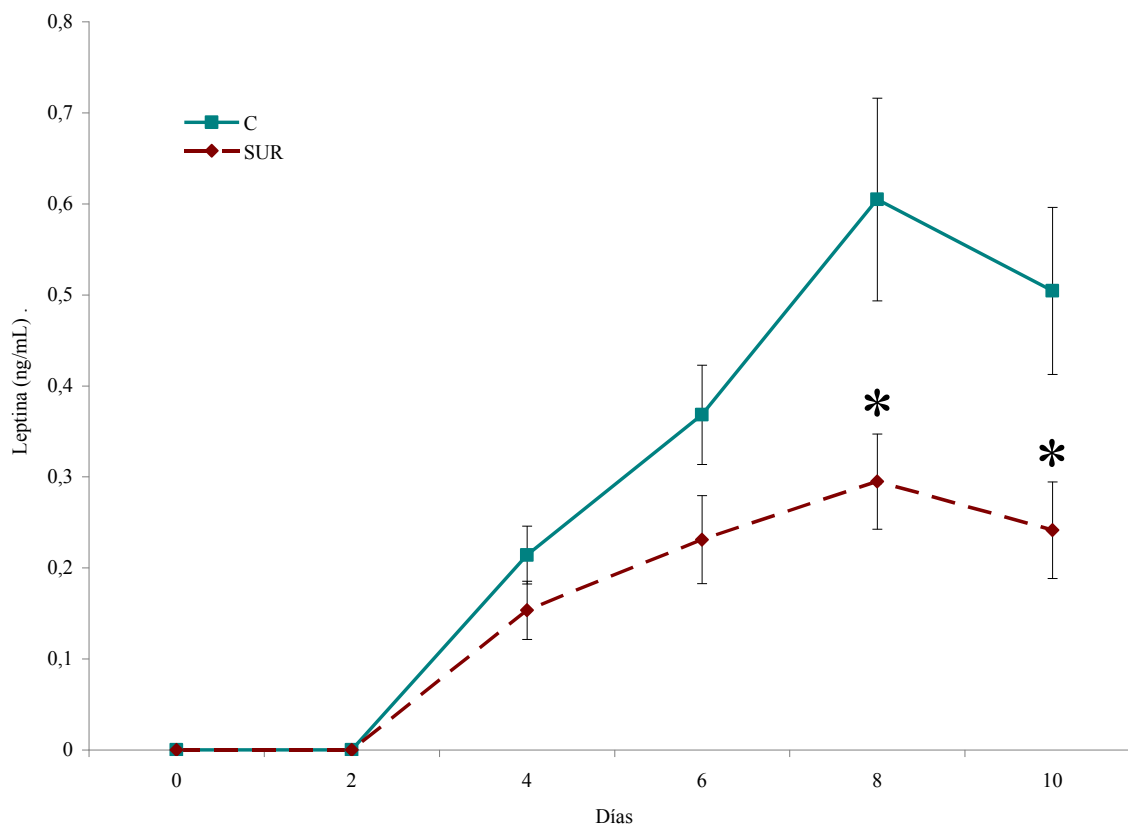
Por el contrario, no encontramos diferencias significativas en la expresión de PPAR $\gamma$ -2 y Zfp-423 (figura 19).



**Figura 19:** Expresión relativa de ppar $\gamma$ -2 y Zfp-423 en tejido adiposo visceral en ambos grupos. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con 5 muestras por grupo. No se encontraron diferencias significativas.

### Secreción de leptina en función de los días de diferenciación

La secreción de leptina liberada al medio de cultivo en los distintos días de diferenciación, mostró que la hormona fue detectable a partir del día 4 en ambos grupos, y que luego fue progresivamente en aumento, siendo éste significativamente menor en el grupo suramina a partir del día 8 ( $p < 0,05$ ) (Figura 20).

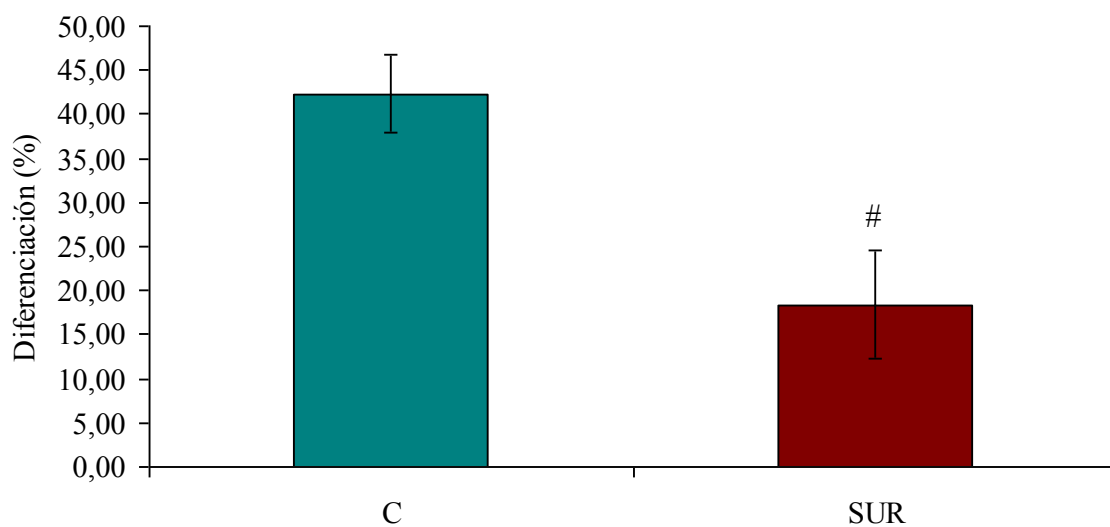


**Figura 20:** Secreción de leptina en función de los días de diferenciación. Los valores se grafican como la media  $\pm$  EEM, con un mínimo de 10 pocillos/día. La secreción es detectable recién desde el día 4 en ambos casos, y las diferencias son significativas recién a partir del día 8, donde \*  $p < 0,05$ .

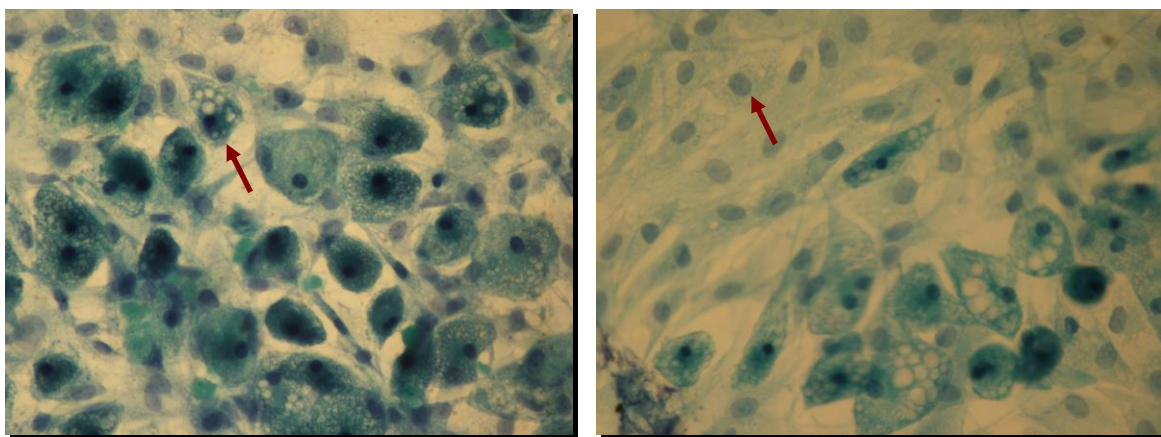
#### Porcentaje de células diferenciadas a fin de cultivo (día 10 de diferenciación)

Al final del período de diferenciación, el porcentaje de células diferenciadas correspondiente al grupo suramina fue significativamente menor que el correspondiente al grupo control (Figuras 21 y 22). Las células indiferenciadas mostraron núcleos laxos y con presencia de nucléolos, mientras que las diferenciadas mostraron núcleos picnóticos y vacuolas lipídicas.





**Figura 21:** Porcentaje de células diferenciadas a fin del cultivo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM, con un mínimo de 15 campos por animal y 5 animales por grupo. La diferencia es significativa, con #  $p < 0,02$ .



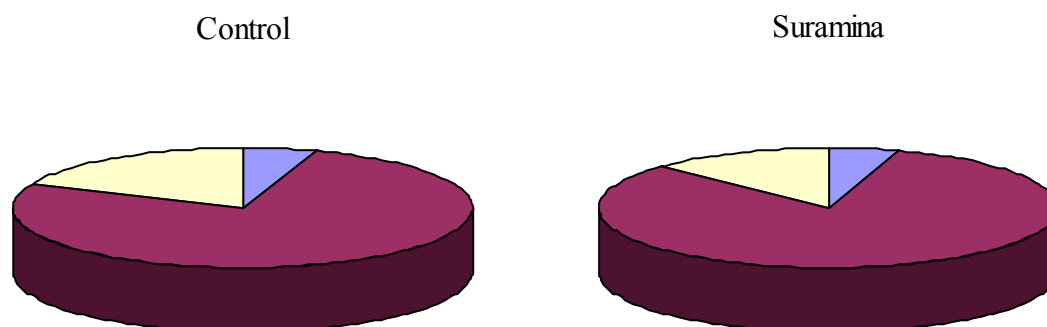
**Figura 22:** Microfotografía del campo de un animal control (izquierda) y suramina (derecha). Tinción de Papanicolaou, aumento 400 X. Obsérvese las diferencias morfológicas características entre los núcleos de las células diferenciadas (claramente picnóticos) e indiferenciadas (laxos y con presencia de nucléolos), así como la presencia de vacuolas lipídicas en las primeras.

### Determinación de grados de diferenciación de células al fin de cultivo (día 10 de diferenciación)

Tal como se describiera en materiales y métodos, las células diferenciadas se clasificaron en sus 3 estadios madurativos (grado 1, 2 y 3). Los resultados se muestran en la tabla 8 y se grafican en la figura 23. Allí puede apreciarse un aumento significativo solo en el grado 2 en el grupo suramina (Chi cuadrado  $p < 0,05$ ).

Grupo	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Control	5,2%	76,5%	18,3%
Suramina	5,1%	81,9%*	13,0%

**Tabla 8:** Grados de diferenciación de las células a fin de cultivo en ambos grupos. La diferencia porcentual en la categoría grado 2 es significativa para el test de Chi cuadrado (\*  $p < 0,05$ ).

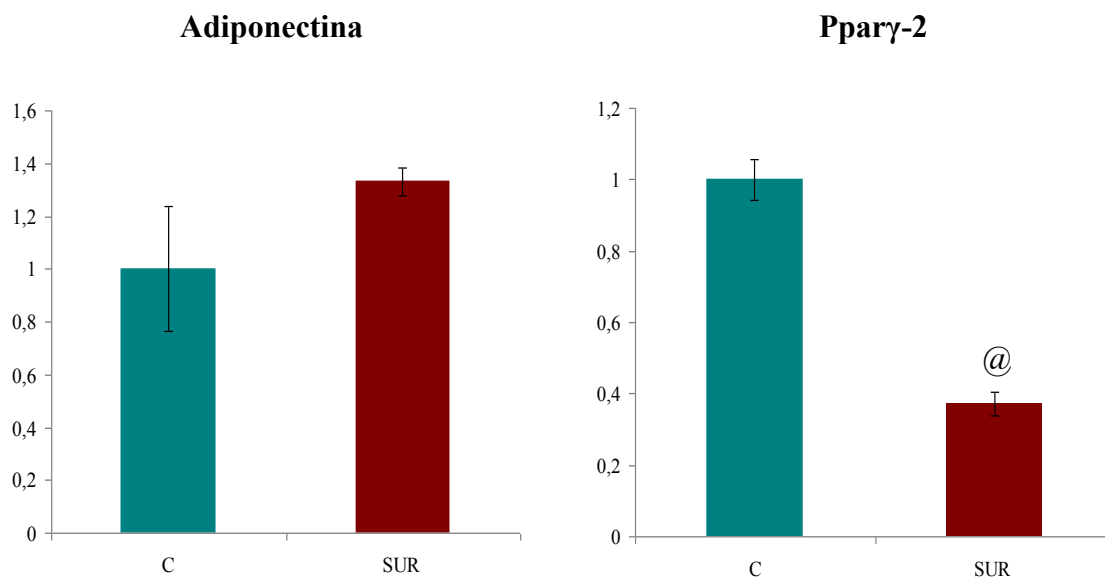


**Figura 23:** Representación en gráfico de torta de la composición porcentual de los diferentes grados de diferenciación de las células a fin de cultivo. Los colores corresponden a: celeste = grado 1, rojo = grado 2, amarillo = grado 3.

### Expresión génica de células al término del período de cultivo (día 10 de diferenciación)

Al finalizar el cultivo se estudió la expresión de dos genes relacionados con el metabolismo de las células adiposas y el proceso adipogénico (adiponectina y PPAR $\gamma$ -2).

Mientras el primero no mostró cambios significativos entre ambos grupos, el último mostró una disminución significativa del grupo tratado respecto al grupo control (figura 24).



**Figura 24:** Expresión relativa de Adiponectina y Pparg-2 en células a fin del cultivo en ambos grupos. Los valores representan la media  $\pm$  EEM, con 5 animales por grupo. La significación es @  $p < 0,01$  sólo para el último caso.

## **DISCUSIÓN**

Como planteamos en la sección introductoria, la relación angiogénesis/adipogénesis viene sugerida desde los orígenes mismos del estudio del tejido adiposo. Trabajos previos a la presente tesis habían demostrado que el suministro de diferentes inhibidores angiogénicos: endostatina (el ya mencionado fragmento carboxilo terminal del colágeno tipo XVIII), TNP-470, angiostatina (dominios tipo *kringle* del 1 al 4 del plasminógeno), Bay-129566 y Thalidomida, a animales de edad avanzada y peso estable de la cepa Ob/Ob, disminuían el peso corporal a expensas de una disminución de la masa de tejido adiposo. Este hecho evidenció una especial sensibilidad de los vasos de dicho tejido a la inhibición, incluso luego de finalizar su desarrollo madurativo (Rupnick *et al.*, 2002).

Nuestros resultados referidos a parámetros alimentarios (consumo diario de alimento y agua), corporales (peso corporal y masa de tejido adiposo visceral), plasmáticos (glucemia, insulinemia, trigliceridemia, ácidos grasos libres, leptinemia y TBARS), demuestran que la administración de una única dosis de nuestro inhibidor de la angiogénesis (suramina), no generó cambios significativos en ninguno de ellos. Contrariamente, disminuyó significativamente su área vascular y el diámetro adipocitario promedio. Esto sugiere que tanto el área vascular como el diámetro adipocitario promedio del tejido adiposo tendrían una susceptibilidad especial a la inhibición angiogénica (Christiaens *et al.*, 2010). En este aspecto, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por un estudio previo realizado con otro inhibidor angiogénico (TNP-470). En dicho estudio (Bråkenhielm *et al.*, 2002) lograron la inhibición angiogénica en ratones C57BL6 de la cepa Ob/Ob, empleando dosis de 20 mg/kg/día de TNP-470. Al finalizar dicho tratamiento observaron una disminución del número de vasos/mm<sup>2</sup> en el grupo tratado respecto al control, asociado a disminución del diámetro adipocitario. No hubo cambios significativos en glucemia, ácidos grasos no esterificados ni trigliceridemia; pero sí una disminución de la colesterolemia y de la insulinemia. Estos dos últimos hallazgos que difieren de los nuestros, eran de esperarse ya que el modelo de Bråkenhielm emplea ratones con obesidad espontánea (Ob/Ob) o normales con dieta alta en grasa, mientras que en nuestro caso empleamos ratas normales. También demostraron que en su modelo, el TNP-470, no inhibe la proliferación de células

FEV ni su capacidad adipogénica (medida sólo como capacidad de acumular grasa intracelular).

Volviendo a nuestro modelo, la inhibición de la angiogénesis en el tejido adiposo visceral, se acompañó de un aumento del ARNm correspondiente a las caspasas 3, 8 y 9 sin cambios en los niveles de Bcl-2. Esto sugeriría un aumento de la apoptosis adipocitaria por ambas vías (intrínseca y extrínseca), que sumado a una igual masa de tejido adiposo en ambos grupos y el menor diámetro en el grupo tratado indicaría una posible fibrosis incipiente del tejido en este último.

Cabe recordar que la fibrosis del tejido adiposo en condiciones de hipoxia es un hecho conocido. Halberg y colaboradores (2009) demostraron que roedores alimentados con dieta alta en grasa, en pocos días duplicaban su área adipocitaria en ciertos panículos y creaban rápidamente condiciones de hipoxia local. En estos estados, aumenta el HIF1 $\alpha$  (Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ ); éste último *per se*, induce en tejidos tumorales una respuesta proangiogénica mientras que en el tejido adiposo desencadena una respuesta promotora de fibrosis.

En el tejido adiposo visceral de nuestros animales tratados con suramina también observamos un aumento de ARNm de ambas angiopoyetinas y del VEGF-A asociado a un descenso de la endostatina respecto a sus controles. Esta última participa en el mecanismo de inhibición angiogénica (O'Reilly *et al.*, 1997). Dado que nuestra intervención farmacológica consiste en la administración de una sola dosis de suramina y que la droga posee una vida media plasmática de 40 a 50 días (Collins *et al.*, 1986), su descenso sería una reacción compensadora ante la inhibición angiogénica. Lo mismo puede decirse de los aumentos de ambas angiopoyetinas. El VEGF-A, por su parte, también muestra una reacción compensadora. Evidencias previas (Middaugh *et al.*, 1992) demostrando que la suramina tiene la capacidad de unirse a factores de crecimiento promoviendo su microagregación e incluso cambios conformacionales, apoyan dicha interpretación.

Cabe consignar que todas las consideraciones respecto a los resultados de los niveles de ARNm de los distintos genes son aplicables a ambas cepas de animales, tanto Wistar como Sprague Dawley.

Por su parte, el análisis de la composición de ácidos grasos del tejido adiposo visceral demostró como único cambio significativo un descenso del ácido palmitoleico (16:1) en el grupo tratado respecto al control. Este ácido es producto directo de la acción de la EsteroilCoA desaturasa sobre el ácido palmítico y se lo considera un indicador del grado de lipogénesis endógena (Kunešová *et al* 2002). En consecuencia, su disminución indicaría que los adipocitos de los animales tratados desarrollarían una actividad lipogénica menor que los de sus pares control. Este resultado formaría parte del contexto general del animal tratado, que como mencionamos antes, presenta apoptosis adipocitaria y adipocitos de menor diámetro. Estos dos últimos hallazgos, por su parte, son similares a los obtenidos por el grupo de trabajo de Randy Seeley (Kim *et al*, 2012), mediante administración de un péptido proapoptótico dirigido a las células endoteliales del tejido adiposo blanco. Si bien en su modelo no alcanzó significación estadística, los autores observaron un descenso del diámetro adipocitario promedio en el grupo tratado respecto al control. También observaron una mayor aparición de estructuras “corona-símiles” (*crownlike*), alrededor de los adipocitos, causada por la actividad de los macrófagos ante la muerte adipocitaria, y una distribución de áreas adipocitarias reveladoras de un mayor porcentaje de adipocitos pequeños en detrimento de los grandes.

En nuestro modelo, el análisis de las células de la fracción estroma vascular mostró una cantidad comparable en ambos grupos. Además, la citometría de flujo reveló igual porcentaje de células progenitoras adipocitarias (CD34+, CD31-, CD45-) en ambos grupos, que sin embargo fue significativamente menor en el grupo suramina cuando el número de células se expresa por animal. Este hecho, que *a priori* pareciera inconsistente, tendría una explicación plausible: si bien el porcentaje de CPA es inferior (pero no significativamente) en el grupo tratado y la menor cantidad de células FEV en el mismo grupo tampoco es significativa, ambos fenómenos considerados en conjunto resultan en una disminución significativa del número de CPA de cada animal tratado respecto a su control. La diferencia en la capacidad adipogénica *in vivo* que generaría esta disminución, no se manifestaría en los cultivos *in vitro* al sembrar igual cantidad de células FEV (15.000 células por pocillo) en ambos grupos al comienzo del cultivo. Sería razonable entonces preguntarse: si el animal tratado posee menor cantidad de células progenitoras adipocitarias, ¿por qué no se

observa una menor cantidad de adipocitos en el tejido adiposo del grupo tratado respecto al control?

La respuesta sería que, como demuestran Spalding y colaboradores (Spalding *et al.*, 2008), la renovación adiposa del tejido es de un 10% anual. Si bien el dato de este autor está basado en adultos humanos sanos, dado que no existe ningún estudio similar en ratas podemos asumir que probablemente sería necesario mucho más tiempo que nuestras dos semanas de tratamiento para observar dicho cambio.

Analizando la expresión génica de las células FEV encontramos que ellas exhiben un menor compromiso hacia el linaje adipocitario en el grupo suramina respecto al control. Esto se evidencia por la disminución en los niveles de ARNm de Zfp-423 y PPAR $\gamma$ -2. Como sabemos, ambos guardan una estrecha correlación, dado que Zfp-423 es un regulador transcripcional de la diferenciación adipocitaria con influencia directa sobre PPAR $\gamma$ -2 (Gupta *et al.* 2010), y éste último es conocido por su papel fundamental en el mismo proceso (Rosen *et al.* 2000). Cabe consignar que algunos autores lo consideran como el regulador principal maestro de la adipogénesis (Tontonoz *et al.*, 2008).

Las células FEV de ambos grupos en cultivo muestran curvas de proliferación con perfiles similares pero de diferente cinética: parten y llegan a un *plateau* de valores similares pero la curva del grupo tratado está desplazada hacia la izquierda, y dicho desplazamiento es significativo entre los días 1 al 4 inclusive respecto a la curva control (con  $p < 0,02$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,01$  para cada día, respectivamente). Podría interpretarse entonces que la inhibición de la angiogénesis inducida por suramina promueve una mayor velocidad de crecimiento de las células FEV respecto al control, que *no* resulta finalmente en una mayor cantidad de células capaces de diferenciarse. Es de destacar que esta observación podría interpretarse como un mecanismo compensatorio, ya que sabemos que las células de la FEV segregan múltiples factores de crecimiento proangiogénicos y antiapoptóticos a niveles que son bioactivos. En este sentido, empleando un modelo de isquemia unilateral en ratones, se demostró que la inyección de células FEV en el lugar afectado genera una angiogénesis capaz de reperfundir el tejido hasta llevarlo a niveles comparables al de la extremidad no afectada (Rehman *et al.*, 2004). Dicho efecto es explicado, al menos en parte, a que estas células responden a la hipoxia con un aumento de secreción de VEGF.

El análisis de expresión génica de las células al fin del período de proliferación mostró un aumento de la expresión de Pref-1 (Factor preadipocitario) en el grupo tratado respecto al control. El Pref-1 ejerce un efecto inhibitor sobre la adipogénesis (Rodeheffer *et al.* 2008, Wang *et al.* 2006, Smas *et al.* 1999), y este aumento de su expresión en el grupo tratado sugiere que a fin de la etapa de proliferación, las células del grupo suramina se encuentran en un estado de mayor inhibición adipogénica que sus homólogas del grupo control. La menor secreción de leptina al medio durante los sucesivos días de diferenciación apoya esta aseveración, ya que como mencionamos en la introducción, los niveles de leptina indican la cantidad de adipocitos maduros funcionales presentes (Friedman *et al.*, 1994). Nuevamente aquí podría surgir la pregunta ¿Por qué si los niveles de leptina secretados al medio de cultivo son menores en el grupo tratado respecto al control no se observan diferencias en las leptinemias de ambos grupos?

Dicha pregunta parte de una interpretación incorrecta, ya que no es posible extrapolar directamente el resultado de un estudio *in vitro* (donde las células han sido aisladas de su matriz extracelular, influencias endocrinas y paracrinas), a un comportamiento *in vivo* donde todos estos factores coexisten y se retroalimentan. En este sentido, existe un estudio comparativo sobre el comportamiento diferencial de los perfiles lipídicos de diferentes tejidos adiposos de ratón y el perfil lipídico obtenido de la maduración *in vitro* de células 3T3-L1, BAT-C1 y mesenquimáticas de la oreja. En él, Liaw y sus colaboradores (Liaw *et al.*, 2016), encuentran que los tres modelos de maduración *in vitro* anteriormente mencionados poseen mayor cantidad de clases de lípidos diferentes que cualquiera de los tres tejidos estudiados (tejido adiposo marrón interescapular, tejido adiposo blanco perirrenal y tejido adiposo blanco inguinal). Justifican la diferencia planteando que si bien han obtenido perfiles lipídicos de los tres tejidos mencionados, éstos no pertenecen a los adipocitos *per se*, ya que los tejidos contienen muchas estirpes celulares incluyendo células FEV, células musculares y endoteliales vasculares que contribuyen a la heterogeneidad de la muestra lipídica. Por ello argumentan que los cultivos *in vitro* resultan herramientas muy útiles en la comprensión y comparación de la contribución de las CPA a la síntesis y degradación de lípidos específicos durante el proceso de diferenciación.



Como corolario del estado de inhibición adipogénica registrada en el grupo tratado, al final del período de cultivo se encontró en el grupo suramina un menor porcentaje de células diferenciadas respecto al control. El hecho coincide con los resultados del análisis de grados de diferenciación, que reveló una cantidad significativamente mayor de células en grado II en el grupo suramina respecto a control y una menor cantidad (no significativa) de células en grado III con prácticamente igual cantidad de células en grado I en ambos grupos.

Finalmente, y en el mismo sentido, el análisis de la expresión de marcadores génicos de las células al final del proceso de diferenciación, muestra una menor diferenciación del grupo suramina respecto al grupo control (menor nivel de ARNm correspondiente a Ppar $\gamma$ -2 y cantidades significativamente similares de ARNm de adiponectina).

Como conclusión, la inyección de suramina (100 mg/Kg) a ratas normales inhibe la angiogénesis y altera el funcionamiento del tejido adiposo, sin afectar significativamente ninguno de los parámetros alimentarios, somáticos y séricos medidos. En consecuencia los animales tratados poseen un tejido adiposo con menor capacidad lipogénica, con adipocitos de menor diámetro y tendientes a la apoptosis y con probabilidad de dicho tejido de generar fibrosis. Además el tejido de los animales suramina posee menor cantidad total de células de la FEV con igual porcentaje de CPA que el control. Dichas células proliferan más rápidamente que las del animal control, aunque detienen su proliferación antes, lo que determina que en los cultivos de células FEV de ambos grupos experimentales lleguen a la etapa de diferenciación con una cantidad comparable de células. Al comenzar dicha etapa, la expresión génica de las células del grupo tratado muestra una mayor inhibición adipogénica que la de sus homólogas control. En el mismo sentido, liberan menos leptina al medio durante los sucesivos días de diferenciación. Al finalizar el cultivo, las células del grupo tratado muestran menor diferenciación, tanto en marcadores génicos como en porcentaje y grados de diferenciación. Toda esta evidencia experimental nos permite afirmar que la angiogénesis y la adipogénesis (tanto a nivel tisular como a nivel celular), son procesos interrelacionados e interdependientes, y como tales, la afectación de uno repercute negativamente sobre el otro.

**BIBLIOGRAFIA**

Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Kashyap S, Schauer PR, Feldstein AE. "Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis." *J Biol Chem*. 2010 Jan 29;285(5):3428-38.

Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, Bernard S, Arner P. "Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology." *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):105-9.

Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. "Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension." *Nature*. 1999 Dec 23-30;402(6764):880-3.

Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, Rossetti L. "Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance." *Diabetes*. 1999 Jan;48(1):94-8.

Basilio Moreno Esteban, Susana Monereo Megías, Julia Álvarez Hernández. "Obesidad: La epidemia del siglo XXI." Ediciones Díaz de Santos, 2000.

Bento CF, Fernandes R, Matafome P, Sena C, Seíça R, Pereira P. "Methylglyoxal-induced imbalance in the ratio of vascular endothelial growth factor to angiopoietin 2 secreted by retinal pigment epithelial cells leads to endothelial dysfunction." *Exp Physiol*. 2010 Sep;95(9):955-70.

Berg AH, Scherer PE. "Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease." *Circ Res*. 96: 939-949, 2005.

Berthier MT, Paradis AM, Tchernof A, Bergeron J, Prud'homme D, Després JP, Vohl MC. "The interleukin 6-174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men" *Journal of Human Genetics* 48 (1): 14–19, 2003.

Bertrand HA, Masoro EJ, Yu BP. "Increasing adipocyte number as the basis for perirenal depot growth in adult rats." *Science* 201: 1234 – 1235, 1978.

Boden G, Homko C, Mozzoli M, Showe LC, Nichols C, Cheung P. “Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients.” *Diabetes*. 2005 Mar;54(3):880-5.

Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. “Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome” *Endocrinology* 148 (10): 4687–4694, 2007.

Bradford MM “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” *Anal Biochem* 72. 248–254, 1976.

Bray GA. “Obesity: Historic development of scientific and cultural ideas.” *Int J Obes Relat Metab Disord*. 14: 909-926, 1990.

Cano Barquilla P, Pagano ES, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos P, Esquifino AI, Cardinali DP. “Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats” *J Pineal Res*. 57 (3):280-290, 2014

Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. “Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6390–6395.

Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. “Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future” *J Lipid Res*. Feb 2012 ;53(2):227-46.

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. “Adiponectin: more than just another fat cell hormone?.” *Diabetes Care* 26 (8): 2442-2450, 2003.

Chaput J.P., Klingenberg L., Astrup A., Sjödín A. M. “Modern sedentary activities promote overconsumption of food in our current obesogenic environment” *Obes. Rev*. 12: e12–20, 2011.

Chen J, Dodson MV, Jiang Z. “Cellular and molecular comparison of redifferentiation of intramuscular- and visceral-adipocyte derived progeny cells.” *Int J Biol Sci.* (2010) Jan 21;6(1):80-8.

Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. “Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans.” *J Lipid Res.* 2005 Nov;46(11):2347-55. Epub 2005 Sep 8.

Clark ER, Clark EL. “Microscopic studies of the new formation of fat in living adult rabbits.” *Am. J. Anat.* 67: 255 – 285, 1940.

Coats J. “A Manual of Pathology.” H. C. Lea’s Sons and Co., Philadelphia. 123, 1883.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. “Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.” *The New England Journal of Medicine* 334 (5): 292-295, 1996.

Correia M L G, Haynes W G. “A role for plasminogen activator inhibitor-1 in obesity: from pie to PAI?” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (10): 2183–2185, 2006.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. “Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus”. *Nature* 411 (6836): 480-484, 2001.

Cristancho AG, Lazar MA. “Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation.” *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Sep 28;12(11):722-34.

Díez JJ and Iglesias P. “The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease.” *European Journal of Endocrinology* 148 (3): 293-300, 2003.

Elias I, Franckhauser S, Ferre T, Vila L, Tafuro S, Munoz S, Roca C, Ramos D, Pujol A, Riu E, Ruberte J, Bosch F. “Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth

factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance.” *Diabetes* 61: 1801–1813, 2012.

Ernst MC, Sinal CJ. “Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity,” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21 (11): 660–667, 2010.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. “Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans.” *Endocrinology* 145 (5): 2273–2282, Epub 2004 Jan 15.

Fariña JP, García ME, Alzamendi A, Giovambattista A, Marra CA, Spinedi E, Gagliardino JJ. “Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction.” *Clin Sci (Lond)*. 1;125(2):87-97, 2013.

Fernández-Real JM, Ricart W. “Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome,” *Endocrine Reviews* 24 (3): 278–301, 2003.

Festa A, D’ Agostino R, Tracy RP, Haffner SM. “Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study” *Diabetes* 51 (4): 1131–1137, 2002.

Festy F, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Péquin AM, Gonthier MP, Munstun A, Hoarau JJ, Césari M, Roche R. “Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes.” *Histochem Cell Biol.* (2005) Aug;124(2):113-21.

Fleck , SJ. “Body composition of elite American athletes”. *Am. J. Sports Med.* 11: 398–403, 1983.

Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM. “Severely Impaired Adipsin Expression in Genetic and Acquired Obesity”. *Science.* 237 (4813): 405-408, 1987

Folch j, Lees m, Sloane stanley gh. “A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.” *J Biol Chem.* May;226(1):497-509, 1957.

Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. “Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 25;103(17):6676-81. Epub 2006 Apr 14.

Giovambattista A, Chisari AN, Gaillard RC, Spinedi E. (2000) “Food intake-induced leptin secretion modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis response and hypothalamic Ob-Rb expression to insulin administration.” *Neuroendocrinology*. 2000 Dec;72(6):341-9.

Goossens GH, Bizzarri A, Venticlef N, Essers Y, Cleutjens JP, Konings E, Jocken JW, Cajlakovic M, Ribitsch V, Clement K, Blaak EE. “Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation.” *Circulation* 124: 67–76, 2011.

Green H, Meuth M. “An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture.” *Cell*. 3: 127 – 133, 1974 .

Haglund E, Sulkowska JI, Noel JK, Lammert H, Onuchic JN, Jennings PA. “Pierced Lasso Bundles Are a New Class of Knot-like Motifs.” *PLoS Comput Biol* 19; 10(6):e1003613, 2014.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. “Weight-Reducing Effects of the Plasma Protein Encoded by the obese Gene”. *Science*. 269 (5223): 543-546, 1995

Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA, Scherer PE. “Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue.” *Mol Cell Biol*. 2009 Aug;29(16):4467-83.

Heikkinen S, Argmann C, Feige JN, Koutnikova H, Champy MF, Dali-Youcef N, Schadt EE, Laakso M, Auwerx J. “The Pro12Ala PPARgamma2 variant determines metabolism at the gene-environment interface.” *Cell Metab*. 2009 Jan 7;9(1):88-98.

Heinonen S, Saarinen L, Naukkarinen J, Rodríguez A, Frühbeck G, Hakkarainen A, Lundbom J, Lundbom N, Vuolteenaho K, Moilanen E, Arner P, Hautaniemi S,

Suomalainen A, Kaprio J, Rissanen A, Pietiläinen KH. “Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity.” *Int J Obes (Lond)*. 2014 Nov;38(11):1423-31.

Hellman B, Hellerstrom C. “Cell renewal in the white and brown fat tissue of the rat” *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 51 : 347 – 353, 1961.

Hennan JK, Morgan GA, Swillo RE, Antrilli TM, Mugford C, Vlasuk GP, Gardell SJ, Crandall DL. “Effect of tiplaxtinin (PAI-039), an orally bioavailable PAI-1 antagonist, in a rat model of thrombosis” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6 (9): 1558–1564, 2008.

Herbert V, Lau K, Gottlieb C, Bleicher S. “Coated Charcoal Immunoassay of Insulin.” *J Clin Endocr* 25: 1375, 1965.

Herold C, Rennekampff HO, Engeli S. “Apoptotic pathways in adipose tissue.” *Apoptosis*. Aug;18(8):911-6, 2013.

Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, Andersson DP, Qvisth V, Löfgren P, Rydén M, Thörne A, Wirén M, Palmér M, Thorell A, Toft E, Arner P. “Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity.” *Diabetologia* 53: 2496–2503, 2010.

Hollenberg CH, Vost A. “Regulation of DNA synthesis in fat cells and stromal elements from rat adipose tissue.” *J. Clin. Invest*. 47 : 2485 – 2498, 1969.

Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. “Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation.” *Diabetes* 56 : 901-911, 2007

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. “Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.” *Science*. Jan 1;259(5091):87-91, 1993.

Jordi Salas Salvadó, Pilar García Lorda, Josep M, Sànchez i Ripollès. “La alimentación y la nutrición a través de la historia”, Editorial Glosa, S.L., 2005

Juhan-Vague I, Alessi MC, Mavri A, Morange PE. “Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1 (7): 1575–1579, 2003.

Kershaw EE, Flier JS. “Adipose tissue as an endocrine organ.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89 (6): 2548-2556, 2004.

Kim JA, Jang HJ, Martinez-Lemus LA, Sowers JR. “Activation of mTOR/p70S6 kinase by ANG II inhibits insulin-stimulated endothelial nitric oxide synthase and vasodilation”. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E201–E208, 2012.

Kim (2) JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. “Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue.” *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2621-37.

Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, Mohammed BS. “Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease.” *N Engl J Med*. 2004 Jun 17;350(25):2549-57.

Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. “Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling.” *Nature*. 1992 Jan 30;355(6359):446-9.

Kunešová M, Phinney S, Hainer V, Tvrzická E, Štich V, Pařízková J, Žák A, Stunkard A. “The responses of serum and adipose Fatty acids to a one-year weight reduction regimen in female obese monozygotic twins”. *Ann N Y Acad Sci*. 2002b; 967:311–323.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T “PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance.” *Mol Cell*. 1999 Oct;4(4):597-609.



- Laplane M, Festuccia WT, Soucy G, Gélinas Y, Lalonde J, Berger JP, Deshaies Y. "Mechanisms of the depot specificity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action on adipose tissue metabolism." *Diabetes*. 2006 Oct;55(10):2771-8.
- Leal VO, Mafra D. "Adipokines in obesity." *Clinica Chimica Acta*, 419: 87-94, 2013.
- Liaw L, Prudovsky I, Koza RA, Anunciado-Koza RV, Siviski ME, Lindner V, Friesel RE, Rosen CJ, Baker PR, Simons B, Vary CP. "Lipid Profiling of In Vitro Cell Models of Adipogenic Differentiation: Relationships with Mouse Adipose Tissues." *J Cell Biochem*. Feb 22. doi: 10.1002/jcb.25522, 2016.
- Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, Lin CS. "Defining stem and progenitor cells within adipose tissue." *Stem Cells Dev*. 17 : 1053 – 1063, 2008.
- Linde S, Hansen B, Lernmark A. "Stable iodinated polypeptide hormones prepared by polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal Biochem*. Sep 1;107(1):165-76, 1980
- Liszka TG, Dellon AL, Im M, Angel MF, Plotnick L. "Effect of lipectomy on growth and development of hyperinsulinemia and hyperlipidemia in the Zucker rat." *Plast Reconstr Surg*. Sep;102(4):1122-7, 1998.
- Malik, V. S., Popkin, B. M., Bray, G. A., Després, J. P., Willett, W. C., Hu, F. B. "Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis." *Diabetes Care* 33, 2477–2483, 2010.
- Maury E, Ehala-Aleksejev K, Guiot Y, Detry R, Vandenhooft A, Brichard SM. "Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Sep;293(3):E656-65. Epub 2007 Jun 19, 2007.
- McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. "The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro." *Stem Cells*. May;24(5):1246-53. Epub 2006 Jan 12, 2006.
- Melvin H. Williams. "Nutrición para la salud, la condición física y el deporte", 2003.

Middaugh CR, Mach H, Burke CJ, Volkin DB, Dabora JM, Tsai PK, Bruner MW, Ryan JA, Marfia KE. "Nature of the interaction of growth factors with suramin." *Biochemistry*. 1992 Sep 22;31(37):9016-24.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW. "Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82 (12): 4196-4200, 1997.

Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y. "Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients." *Diabetes Care*. Jun;22(6):908-12, 1999.

Mucci LA, Stark JR, Figg WD, Schumacher F, Li H, Abe M, Hennessy K, Stampfer MJ, Gaziano JM, Ma J, Kantoff PW. "Polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, and prostate cancer risk and survival: A prospective study." *Int J Cancer* 125:1143–1146, 2009.

Ng CW, Poznanski WJ, Borowiecki M, Reimer G. "Differences in growth in vitro of adipose cells from normal and obese patients." *Nature* . 231 : 445, 1971.

Nielsen JS, McNagny KM. "Novel functions of the CD34 family." *J Cell Sci*. Nov 15;121(Pt 22):3683-92, 2008.

Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, Rodríguez-Hermosa JI, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Fruhbeck G, Tinahones FJ, Fernández-Real JM. "The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects." *Obesity (Silver Spring)* 2010 18:13 – 20.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. "Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease." *Curr Opin Lipidol* 14, 561-566, 2003.

Peckham SC, Entenman C, Carroll HW. "The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat." *J. Nutr.* 77 : 187 – 197, 1962.

Pfaffl MW. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res.* May 1;29(9):e45, 2001.

Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. "The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease." *Diabetes, Obesity and Metabolism*, vol 12, no 5, pp 365-383, 2010.

Privratsky JR, Newman PJ. "PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity." *Cell Tissue Res.* Mar;355(3):607-19, 2014.

Rajashekhar G, Traktuev DO, Roell WC, Johnstone BH, Merfeld-Clauss S, Van Natta B, Rosen ED, March KL, Clauss M. "IFATS collection: Adipose stromal cell differentiation is reduced by endothelial cell contact and paracrine communication: role of canonical Wnt signaling." *Stem Cells.* Oct;26(10):2674-81, 2008.

Rebolledo A, Rebolledo OR, Marra CA, García ME, Roldán Palomo AR, Rimorini L, Gagliardino JJ. "Early alterations in vascular contractility associated to changes in fatty acid composition and oxidative stress markers in perivascular adipose tissue." *Cardiovasc Diabetol.* Oct 21;9:65, 2010.

Rebolledo OR, Marra CA, Raschia A, Rodriguez S, Gagliardino JJ. "Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet." *Horm Metab Res.* Nov;40(11):794-800, 2008.

Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. "PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis." *Genes Dev.* Jan 1;16(1):27-32, 2002.

Rodbell M "Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis." *J. Biol. Chem.* 239 : 375 – 380, 1964.

Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. "Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo." *Cell.* Oct 17;135(2):240-9, 2008.

- Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G. “Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control.” *Cell Cycle*. May 15;10(10):1548-56, 2011.
- Rojas-Rodriguez R, Gealekman O, Kruse ME, Rosenthal B, Rao K, Min S, Bellve KD, Lifshitz LM, Corvera S. “Adipose tissue angiogenesis assay.” *Methods Enzymol*. 537:75–91, 2014.
- Roman AA, Parlee SD, Sinal CJ. “Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes,” *Endocrine*, vol. 42, no. 2, pp. 243–251, 2012.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. “C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway.” *Genes Dev*. Jan 1;16(1):22-6, 2002.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. “PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.” *Mol Cell*. Oct;4(4):611-7, 1999.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. “Transcriptional regulation of adipogenesis.” *Genes Dev*. Jun 1;14(11):1293-307, 2000.
- Rozen S, Skaletsky H. “Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.” *Methods Mol Biol*. 132:365-86, 2000.
- Ruan H, Lodish HF. “Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects on tumor necrosis factor- $\alpha$ .” *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol 14, no 5, pp 447-455, 2003.
- Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. “Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- $\alpha$ : implications for insulin resistance.” *Diabetes*, vol 51, no 11, pp 3176-3188, 2002.

Rupnick, M.A., Panigrahy, D., Zhang, C.Y., Dallabrida, S.M., Lowell, B.B., Langer, R., Folkman, M.J. "Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10730–10735, 2002.

Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T. "Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome." *Circ. J.* 68, 975-981, 2004.

Santos-Álvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. "Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes." *Cell Immunol* 194, 6-11, 1999.

Sarriá A. "Venus paleolíticas y obesidad." *Rev Esp Obes.* 5:13-8, 2007.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." *The Journal of Biological Chemistry*, vol 270, no 45, pp 26746-26749, 1995.

Schindler AE, Abert A, Frederick E. "Conversion of androstenedione to estrone by human fat tissue". *J Clin Endocrinol Metab* 35:627-30, 1972.

Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. "Biological action of leptin as an angiogenic factor." *Science*. Sep 11;281(5383):1683-6, 1998.

Singh R. "Autophagy in the control of food intake." *Adipocyte*. Apr 1;1(2):75-79, 2012.

Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS. "Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation." *J Biol Chem* 274:12632–12641, 1999.

Soumya SJ, Binu S, Helen A, Reddanna P, Sudhakaran PR. "15(S)-HETE-induced angiogenesis in adipose tissue is mediated through activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway." *Biochem Cell Biol* 91:498–505, 2013.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. “Dynamics of fat cell turnover in humans.” *Nature*. 453 : 783 – 787, 2008.

Stenlöf K, Wernstedt I, Fjällman T, Wallenius V, Wallenius K, Jansson JO. “Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 88, no. 9, pp. 4379–4383, 2003.

Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K. “Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells.” *Stem Cells Dev*. Oct;18(8):1201-10, 2009.

Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, Nakao K, Ogawa Y, Yoshimura N. “Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells.” *Diabetes*. Sep;53(9):2443-8, 2004.

Sung HK, Doh KO, Son JE, Park JG, Bae Y, Choi S, Nelson SM, Cowling R, Nagy K, Michael IP, Koh GY, Adamson SL, Pawson T, Nagy A. “Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis.” *Cell Metab*. 17:61–72, 2013.

Tahergorabi Z, Khazaei M. “Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms”. *Int J Prev Med* 3:827–838, 2012.

Tai TA, Jennermann C, Brown KK, Oliver BB, MacGinnitie MA, Wilkison WO, Brown HR, Lehmann JM, Kliewer SA, Morris DC, Graves RA. “Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes brown adipocyte differentiation.” *J Biol Chem*. Nov 22;271(47):29909-14, 1996.

Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. “Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene.” *EMBO J*. Dec 15;16(24):7432-43, 1997.

Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM. "White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature." *Science*. 322 : 583 – 586, 2008.

Tchkonia T, Lenburg M, Thomou T, Giorgadze N, Frampton G, Pirtskhalava T, Cartwright A, Cartwright M, Flanagan J, Karagiannides I, Gerry N, Forse RA, Tchoukalova Y, Jensen MD, Pothoulakis C, Kirkland JL. "Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns." *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jan;292(1):E298-307, 2007.

Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonia T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. "Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding." *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 19;107(42):18226-31, 2010.

Thörne A1, Lönnqvist F, Apelman J, Hellers G, Arner P. "A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding." *Int J Obes Relat Metab Disord*. Feb;26(2):193-9, 2002.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." *Genes Dev*. May 15;8(10):1224-34, 1994.

Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. "Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism." *Cell Metab*. May;7(5):410-20, 2008.

Trujillo ME, Scherer PE. "Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome." *J Intern Med*. Feb;257(2):167-75, 2005.

van Tienen FH, van der Kallen CJ, Lindsey PJ, Wanders RJ, van Greevenbroek MM, Smeets HJ. "Preadipocytes of type 2 diabetes subjects display an intrinsic gene expression profile of decreased differentiation capacity." *Int J Obes (Lond)*. Sep;35(9):1154-64, 2011.

Virtue S, Vidal-Puig A. "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective." *Biochim Biophys Acta*. Mar;1801(3):338-49, 2010.

Wallenius K, Jansson O, Wallenius V. "The therapeutic potential of interleukin-6 in treating obesity." *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol 3, no 7, pp 1061-1070, 2003.

Wang C, Youle RJ. "The role of mitochondria in apoptosis." *Annu Rev Genet*. 43:95-118, 2009.

Wang Y, Kim KA, Kim JH, Sul HS "Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis." *J Nutr* 136:2953–2956, 2006.

Wertheimer E, Shapiro B. "The physiology of adipose tissue". *Physiological Reviews*, vol 28, num 4, p 451-464, 1948.

Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. "Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids." *Mol Cell Biol*. Aug;16(8):4128-36, 1996.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. "Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity." *Mol Cell*. Feb;3(2):151-8, 1999.

Xiao Y, Yuan T, Yao W, Liao K. "3T3-L1 adipocyte apoptosis induced by thiazolidinediones is peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent and mediated by the caspase-3-dependent apoptotic pathway." *FEBS J*. Feb;277(3):687-96, 2010.

Yagi Kunio "A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma." *Biochemical Medicine*, Volumen 15, 2, 212-216, 1976.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity." *Nature Medicine*, vol 7, no 8, pp 941-946, 2001.



Yoon MS, Zhang C, Sun Y, Schoenherr CJ, Chen J. “Mechanistic target of rapamycin controls homeostasis of adipogenesis.” *J Lipid Res* 54:2166–2173, 2013.

Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. “Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates.” *J Cell Physiol.* Jul;208(1):64-76, 2006.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. “Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue”. *Nature* 372, 425–432, 1994.

Zubiría MG, Fariña JP, Moreno G, Gagliardino JJ, Spinedi E, Giovambattista A. “Excess fructose intake-induced hypertrophic visceral adipose tissue results from unbalanced precursor cell adipogenic signals.” *FEBS J.* Nov;280(22):5864-74, 2013.